

Institut für Ernährungswissenschaft  
Professur für Ernährung des Menschen - Ernährungsphysiologische Bewertung von  
Lebensmitteln  
Fachbereich 09 – Agrarwissenschaften, Ökötrophologie und Umweltmanagement  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Einfluss von Milch-Phospholipiden und Soja-Phospholipiden auf  
Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen beim Menschen

Zur Erlangung des Grades „Doctor oecotrophologiae“  
(Dr. oec. troph.)

vorgelegt von  
M.Sc. Anne Weiland  
aus Bad Kreuznach  
Karlsruhe 2012

**Gutachter:**

1. Gutachter: Prof. Dr. Clemens Kunz<sup>1</sup>
2. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Watzl<sup>2</sup>

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen November 2009 und August 2012 im Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung des Max Rubner-Instituts am Standort Karlsruhe angefertigt.

Die Dissertation wurde im Rahmen des Projekts „Entwicklung eines Verfahrens zur Isolierung von Phospholipiden aus Molkenrahm und Nachweis des gesundheitlichen Potentials der Phospholipide“ durchgeführt, gefördert durch den Forschungsbereich der Ernährungsindustrie e.V..

<sup>1</sup> Institut für Ernährungswissenschaft, Justus-Liebig-Universität, Gießen

<sup>2</sup> Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung, Max Rubner-Institut, Karlsruhe

# I Inhaltsverzeichnis

II Abbildungsverzeichnis .....	v
III Tabellenverzeichnis .....	vii
IV Abkürzungsverzeichnis .....	ix
1 Einleitung .....	1
1.1 Phospholipide .....	1
1.1.1 Definition und Einteilung der Phospholipide .....	1
1.1.2 Vorkommen der Phospholipide .....	3
1.1.2.1 Phospholipide in der Kuhmilch .....	4
1.1.2.2 Phospholipide in Sojaprodukten .....	5
1.1.3 Resorption von Phospholipiden .....	6
1.2 Herz-Kreislauf-Erkrankungen .....	9
1.2.1 Definition von Herz-Kreislauf-Erkrankungen .....	9
1.2.2 Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen .....	9
1.2.3 Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen .....	10
1.2.4 Atherosklerose als pathologische Grundlage für Herzinfarkt und Schlaganfall .....	10
1.3 Phospholipide und deren Bedeutung für Herz-Kreislauf-Erkrankungen .....	11
1.3.1 Wirkung von Phospholipiden auf den Lipidstoffwechsel .....	11
1.3.1.1 Hemmung der intestinalen Cholesterinresorption durch Phospholipide .....	12
1.3.1.2 Wirkung der Phospholipide auf den Lipidstoffwechsel .....	14
Tierstudien .....	14
Mechanismen .....	16
Humanstudien .....	17
1.3.2 Wirkung von Phospholipiden auf den Homocysteinspiegel und Glutathionstatus .....	20
1.3.3 Wirkung von Phospholipiden auf Inflammationsparameter .....	23
1.3.4 Wirkung von Phospholipiden auf Diabetes-Parameter .....	23

2	Zielsetzung.....	27
3	Experimenteller Teil .....	29
3.1	Humanstudien.....	29
3.1.1	Fallzahlbestimmung .....	29
3.1.2	Studiendesign .....	29
3.1.3	Blutentnahme und Probengewinnung .....	30
3.1.4	Anthropometrische und physische Messungen .....	30
3.1.5	Erfassung der Energie- und Nährstoffzufuhr .....	31
3.1.6	Restriktionen während der Studie .....	32
3.1.7	Humanstudie 1: Milch-Phospholipide versus Milch-Triglyceride .....	32
3.1.7.1	Durchführung der Humanstudie 1.....	33
3.1.7.2	Studienmilchen der Humanstudie 1 .....	35
3.1.8	Humanstudie 2: Milch-Phospholipide versus Soja-Phospholipide .....	36
3.1.8.1	Durchführung der Humanstudie 2.....	37
3.1.8.2	Studienmilchen der Humanstudie 2.....	39
3.2	Analytische Methoden.....	40
3.2.1	Klinische Routineparameter .....	40
3.2.2	Bestimmung von Homocystein .....	41
3.2.3	Bestimmung von Glutathion und Glutathiondisulfid .....	43
3.2.4	Einzelnukleotidpolymorphismus-Analyse des Genotyps 5-,10-Methylentetra-hydrofolatreduktase C677T .....	45
3.3	Materialien .....	49
3.3.1	Geräte .....	49
3.3.2	Chemikalien und Reagenzien.....	51
3.3.3	Verbrauchsmaterialien .....	52
3.3.4	Kits .....	53
3.4	Statistische Auswertung.....	53
4	Ergebnisse .....	55

4.1	Humanstudie 1 .....	55
4.1.1	Verträglichkeit und <i>Compliance</i> .....	55
4.1.2	Anthropometrische und physische Messungen .....	55
4.1.3	Klinische Parameter .....	56
4.1.4	Ernährungsprotokolle .....	60
4.2	Ergebnisse der Humanstudie 2 .....	67
4.2.1	Verträglichkeit und <i>Compliance</i> .....	67
4.2.2	Anthropometrische und physische Messungen .....	67
4.2.3	Klinische Parameter .....	68
4.2.4	Einzelnukeotidpolymorphismus-Analyse .....	71
4.2.5	Ernährungsprotokolle .....	74
5	Diskussion .....	80
5.1	Auswahl des Studiendesigns .....	80
5.2	Ernährungsprotokolle .....	83
5.3	Interventionseffekte .....	84
5.3.1	Einfluss der Phospholipide auf anthropometrische Parameter .....	84
5.3.2	Einfluss der Phospholipide auf Blutdruck und Pulsfrequenz .....	85
5.3.3	Einfluss der Phospholipide auf den Lipidstoffwechsel .....	86
5.3.4	Einfluss der Phospholipide auf Diabetesparameter .....	89
5.3.5	Einfluss der Phospholipide auf Leberenzyme .....	91
5.3.6	Einfluss der Phospholipide auf weitere Parameter .....	92
5.3.7	Einzelnukeotidpolymorphismus-Analyse des Genotyps 5-,10-Methylentetrahydrofolatreduktase C677T und Einfluss der Phospholipide auf den Homocysteinspiegel .....	93
5.4	Abschließende Betrachtung .....	94
6	Zusammenfassung .....	96
7	Summary .....	99
8	Literaturverzeichnis .....	101

Erklärung .....	117
Danksagung .....	118

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des Phosphatidylcholins. ....	2
Abbildung 2: Struktur des Sphingomyelins. ....	3
Abbildung 3: Phospholipid-Verteilung der Milch. ....	4
Abbildung 4: Fettsäurenmuster in den Phospholipiden der Milchfettkügelchenmembran und Soja-Phospholipiden. ....	5
Abbildung 5: Phospholipid-Verteilung in der Sojabohne. ....	6
Abbildung 6: Schema der Verdauung, Resorption und Stoffwechsel von Phosphatidylcholin im Enterozyten. ....	7
Abbildung 7: Schema der Verdauung, Resorption und Stoffwechsel von Sphingomyelin im Enterozyten. ....	8
Abbildung 8: Methionin-Homocystein-Stoffwechsel in der Leber. ....	22
Abbildung 9: Wirkung von Dilauroyl-Phosphatidylcholin auf Insulin und Lebersteatose. ....	25
Abbildung 10: Fließschema der Humanstudie 1. ....	34
Abbildung 11: Fließschema der Humanstudie 2. ....	38
Abbildung 12: Repräsentatives HPLC/Fluoreszenz-Chromatogramm von Homocystein einer humanen Plasmaprobe. ....	43
Abbildung 13: Typische Schmelzkurven nach dem Aufschmelzen der 5-,10- Methylentetrahydrofolatreduktase-DNA-Amplifikate homo- und heterozygoter Proben. ....	45
Abbildung 14: Typische Schmelzkurven nach dem Aufschmelzen der 5-,10- Methylentetrahydrofolatreduktase-DNA-Amplifikate homozygoter Proben. ....	46
Abbildung 15: Interventionseffekte auf die Aktivität der Leberenzyme $\gamma$ -Glutamyl- transferase, Aspartat-Aminotransferase und Alanin-Aminotransferase. ....	59
Abbildung 16: Änderung der Aktivität von $\gamma$ -Glutamyltransferase und Alanin- Aminotransferase durch die Intervention mit Milch-Phospholipiden bzw. Kontrollmilch. ....	59
Abbildung 17: Täglicher Verzehr von Milch und Milchprodukten während und außerhalb der Humanstudie 1. ....	61

Abbildung 18: Durchschnittliche tägliche Energie- und Nährstoffzufuhr während und außerhalb der Humanstudie 1 inkl. Studienmilch. ....	62
Abbildung 19: Tägliche Cholinzufuhr aus Lebensmitteln und Studienmilchen während der Humanstudie 1. ....	65
Abbildung 20: Tägliche Phospholipidzufuhr aus Lebensmitteln und Studienmilch während der Humanstudie 1. ....	66
Abbildung 21: Aktivität der Leberenzyme $\gamma$ -Glutamyltransferase, Aspartat-Aminotransferase und Alanin-Aminotransferase vor und nach Intervention in der Humanstudie 2. ....	70
Abbildung 22: Änderung der Leberenzyme $\gamma$ -Glutamyltransferase-Aktivität durch die Intervention mit Milch-Phospholipide bzw. Soja-Phospholipide. ....	70
Abbildung 23: Homocysteinkonzentration im Plasma bei Probanden mit C-Allel bzw. T-Allel. ....	72
Abbildung 24: Einteilung der Allelgruppen in Homocysteinbereiche zu Beginn der Humanstudie 2. ....	72
Abbildung 25: Delta-Homocysteinkonzentration bei unterschiedlichen Genotypen. ....	73
Abbildung 26: Täglicher Verzehr von Milch und Milchprodukten während und außerhalb der Humanstudie 2. ....	75
Abbildung 27: Durchschnittliche tägliche Energie- und Nährstoffzufuhr während und außerhalb der Humanstudie 2. ....	76
Abbildung 28: Tägliche Cholinzufuhr aus Lebensmitteln und Studienmilch während der Humanstudie 2. ....	79
Abbildung 29: Tägliche Phospholipidzufuhr aus Lebensmitteln und Studienmilch während der Humanstudie 2. ....	79



### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Glycerophospholipide mit entsprechender Kopfgruppe.....	2
Tabelle 2: Sphingophospholipide mit der Kopfgruppen und dem Rest.....	3
Tabelle 3: Basisdaten der Probanden zu Beginn der Humanstudie 1 .....	33
Tabelle 4: Analysedaten des Milch-Phospholipidpulvers in Humanstudie 1.....	35
Tabelle 5: Zusammensetzung der Studienmilchen in Humanstudie 1.....	36
Tabelle 6: Basisdaten der Probanden zu Beginn der Humanstudie 2 .....	37
Tabelle 7: Analysedaten der Phospholipidpulver in Humanstudie 2. ....	39
Tabelle 8: Fettsäurenmuster der Phospholipide der Phospholipidpulver in Humanstudie 2. ....	40
Tabelle 9: Zusammensetzung der Studienmilchen in Humanstudie 2.....	40
Tabelle 10: Gradientenprogramm der HPLC/Fluoreszenz für die Homocysteinbestimmung. ....	42
Tabelle 11: Primer für die Schmelzkurvenanalyse des Einzelnukleotidpolymorphismus 5-,10-Methylentetrahydrofolatreduktase C677T. ....	47
Tabelle 12: Pipettierschema des Mastermixes für die Schmelzkurvenanalyse des Einzelnukleotidpolymorphismus 5-,10-Methylentetrahydrofolatreduktase C677T. ....	47
Tabelle 13: PCR-Programm am LightCycler480 für die Schmelzkurvenanalyse des Einzelnukleotidpolymorphismus 5-,10-Methylentetrahydrofolatreduktase C677T. ....	48
Tabelle 14: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Geräte in alphabetischer Reihenfolge. ....	49
Tabelle 15: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Chemikalien und Reagenzien in alphabetischer Reihenfolge. ....	51
Tabelle 16: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge. ....	52
Tabelle 17: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Kits in alphabetischer Reihenfolge. ....	53

Tabelle 18: Anthropometrische und physische Parameter in der Humanstudie 1. ....	56
Tabelle 19: Konzentration und Verhältnis von Serumlipiden und Lipoproteinen in der Humanstudie 1. ....	57
Tabelle 20: Konzentration von Diabetes-Parametern in der Humanstudie 1. ....	57
Tabelle 21: Konzentration von GSH, Homocystein, IL-6, sICAM und Complement C3 in der Humanstudie 1. ....	58
Tabelle 22: Durchschnittliche tägliche Zufuhr von Mineralstoffen und Vitaminen während der Humanstudie 1. ....	63
Tabelle 23: Durchschnittliche tägliche Zufuhr einzelner Kohlenhydrate und Fettsäuren bzw. von Fettsäuregruppen und Cholesterin während der Humanstudie 1. ....	64
Tabelle 24: Anthropometrische und physische Parameter in der Humanstudie 2. ....	68
Tabelle 25: Konzentration und Verhältnis von Serumlipiden und Lipoproteinen in der Humanstudie 2. ....	69
Tabelle 26: Konzentration Diabetes-Parametern in der Humanstudie 2. ....	69
Tabelle 27: Konzentration von GSH, Homocystein, hsCRP, IL-6 und sICAM und in der Humanstudie 2. ....	71
Tabelle 28: Tägliche Energie- und Nährstoffzufuhr während der Humanstudie 2. ....	77
Tabelle 29: Tägliche Mineralstoff- und Vitaminzufuhr während der Humanstudie 2. ....	78

## IV Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase, <i>alanine transaminase</i> = Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Apo	Apolipoprotein
AST	Aspartat-Aminotransferase, <i>aspartate transaminase</i> = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
BMI	<i>Body Mass Index</i>
C	Cholesterin
CRP	C-reaktives Protein
CVD	<i>Cardiovascular diseases</i>
DLPC	Dilauroyl-Phosphatidylcholin
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoat)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunoassay</i>
FA	<i>Fatty acid(s)</i>
FS	Fettsäure
FXR	Farnesoid X Rezeptor
GGT	$\gamma$ -Glutamyltransferase, <i><math>\gamma</math>-glutamyltransferase</i>
GPL	Glycerophospholipide
GR	Glutathionreduktase
GS	Gallensalze
GSH	Glutathion reduziert
GSSG	Glutathion oxidiert
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HKE	Herz-Kreislauf-Erkrankungen

HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HOMA-IR	<i>Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance</i>
ICD	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
IL-6	Interleukin-6
KHK	koronare Herzerkrankungen
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
Lp(a)	Lipoprotein (a)
LRH-1	Leber-Rezeptor homolog-1
LysoPC	Lysophosphatidylcholin
MFGM	<i>milk fat globule membrane</i> , MilCHFettkügelchenmembran
MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase
NADP(H)	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidiert/reduziert)
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PEMT	Phosphatidylethanolamin-N-Transferase
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipid(e)
PPAR $\alpha$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
PS	Phosphatidylserin
RM-ANOVA	Varianzanalyse mit Messwiederholung
SBD-F	Ammonium-7-fluorbenzol-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonat
SM	Sphingomyelin
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus

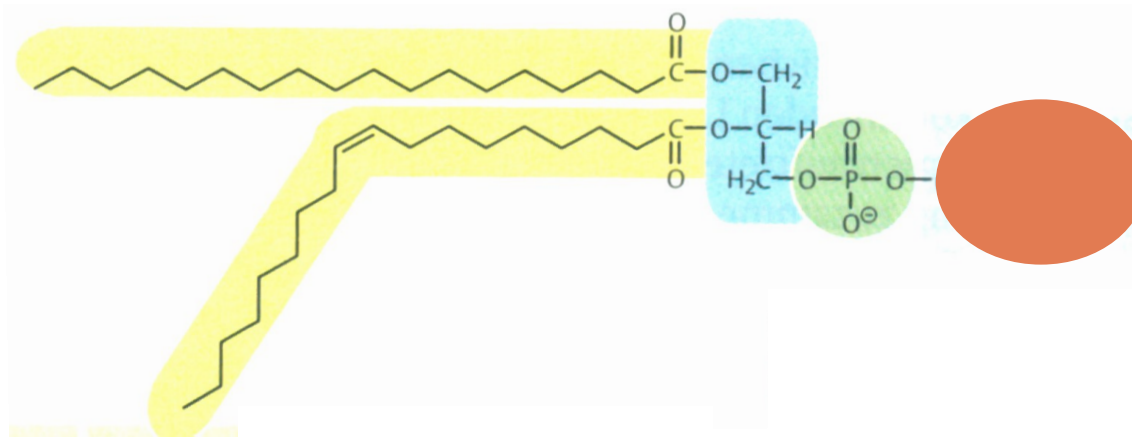
Srebp-1c	<i>sterol regulatory element binding protein-1c</i>
SSA	Sulfosalicylsäure
TG	Triglyceride
TNB	2-Nitro-5-thiobenzoat
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Phospholipide

### 1.1.1 Definition und Einteilung der Phospholipide

Phospholipide (PL) sind phosphathaltige, komplexe polare Lipide, die aus einem hydrophilen Kopf und lipophilen Fettsäure (FS) -Resten bestehen. Dadurch weisen sie amphiphile Eigenschaften auf und bilden im wässrigen Milieu Lipiddoppelschichten. Sie sind ubiquitär in biologischen Membranen als Hauptbestandteil zu finden. PL können in zwei Gruppen unterteilt werden, die Glycerophospholipide (GPL) und Sphingophospholipide (auch Sphingophosphatide oder phosphathaltige Sphingolipide genannt) (Carr und Jesch 2006). Wie in Abbildung 1 dargestellt, bestehen die Glycerophospholipide aus einem Glyceringrundgerüst, zwei veresterten FS an den Positionen sn-1 und sn-2 sowie einer phosphorhaltigen, hydrophilen Kopfgruppe an der Position sn-3. An der Position sn-2 sind sowohl bei pflanzlicher als auch bei tierischer Herkunft überwiegend ungesättigte FS wie Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure, Arachidonsäure (bei tierischen GPLs) oder Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure (bei marinen GPLs) gebunden. An der Position sn-1 hingegen sind vorwiegend gesättigte FS wie die Stearin- und Palmitinsäure verestert (Küllenberg *et al.* 2012). Je nach gebundener Kopfgruppe lassen sich die GPL in verschiedene Klassen einteilen, wie in Tabelle 1 aufgelistet. Daneben wird in der Literatur häufig synonym zu PL der Begriff Lecithin verwendet. Lecithin wird meist aus Soja oder Eigelb gewonnen und enthält etwa 40 bis 50 % PL sowie weitere Fettbegleitstoffe wie Glykolipide, Phytosterine, Tocopherole, Kohlenhydrate und freie Aminosäuren (Arbeitsgruppe Zusatzstofftechnologie und -Analytik 1974).



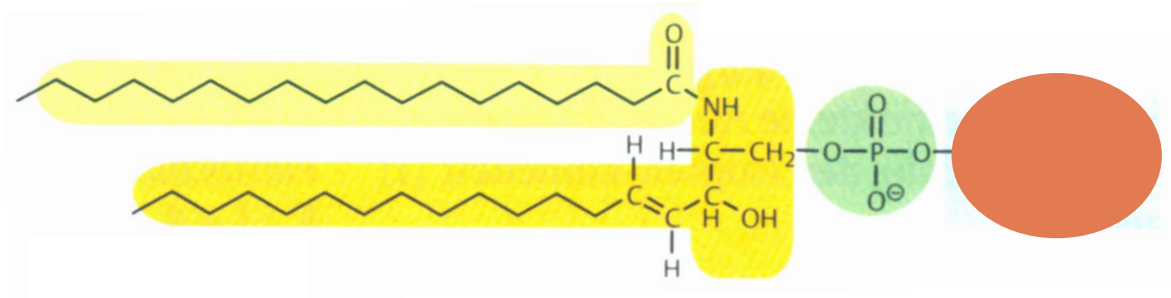
**Abbildung 1: Struktur des Phosphatidylcholins.**

Die Fettsäuren sind gelb, das Glycerol blau, Phosphatid grün und die Kopfgruppe (Aminoalkohol Cholin) orange dargestellt. Modifiziert nach Koolman und Röhme (2003).

**Tabelle 1: Glycerophospholipide mit entsprechender Kopfgruppe.**

Glycerophospholipid	Kopfgruppe
Phosphatidsäure	Wasserstoff
Phosphatidylglycerol	Glycerol
Phosphatidylcholin	Cholin
Phosphatidylethanolamin	Ethanolamin
Phosphatidylserin	Serin
Phosphatidylinositol	Inositol

Die zweite Gruppe sind die Sphingophospholipide. Diese enthalten Ceramid, also eine Sphingoidbase (häufig den Aminoalkohol Sphingosin), an dessen Aminogruppe eine Fettsäure, und an dessen Hydroxylende eine phosphathaltigen Kopfgruppe gebunden ist (Duan 2011). Die Sphingophospholipide werden sowohl den Phospholipiden als auch den Sphingolipiden zugeordnet. Im Gewebe und Lipoproteinen von Säugern ist Sphingomyelin (SM) das vorherrschende Sphingophospholipid (Merrill 2008). Die Strukturformel des Sphingomyelins ist in Abbildung 2 dargestellt. Daneben gibt es aber auch noch weitere Sphingophospholipide, die in Tabelle 2 aufgeführt sind.



**Abbildung 2: Struktur des Sphingomyelins.**

Die Fettsäure ist hellgelb, das Sphingosin dunkelgelb, Phosphatid grün und die Kopfgruppe (Aminoalkohol Cholin) orange dargestellt. Modifiziert nach Koolman und Röhm (2003).

**Tabelle 2: Sphingophospholipide mit der Kopfgruppen und dem Rest.**

Sphingophospholipid	Kopfgruppe	Rest
Sphingomyelin	Phosphocholin	Fettsäure
Sphingosin-1-Phosphat	Phosphat	Wasserstoff
Ceramid-1-Phosphat	Phosphat	Fettsäure
Ceramid-Phosphoethanolamin	Phosphoethanolamin	Fettsäure

### 1.1.2 Vorkommen der Phospholipide

PL bilden aufgrund ihrer starken amphipatischen Eigenschaften die wichtigste Lipid-Gruppe biologischer Membranen. Zu den Membranlipiden zählen neben Glycolipiden, Cholesterin und weiteren Lipiden auch die PL Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS) und Sphingomyelin (SM). Die relativen Anteile der Lipide sind je nach Zell- und Gewebetypus unterschiedlich (Koolman und Röhm 2003). Des Weiteren enthält die Galle eine hohe Menge an PL, vor allem PC, dort übernehmen sie neben den Gallensalzen die Förderung der Lipid-Verdauung indem sie als Emulgatoren wirken und Bestandteil gemischter Mizellen sind (Senior 1964). Auch Ceramid-1-Phosphat spielt in Säugern eine wichtige Rolle, da es die Krümmung der Lipiddoppelschichten beeinflusst, Prozesse wie Phagozytose vermittelt und an Wechselwirkungen mit anderen Lipidsignalwegen teilnimmt (Merrill 2008).

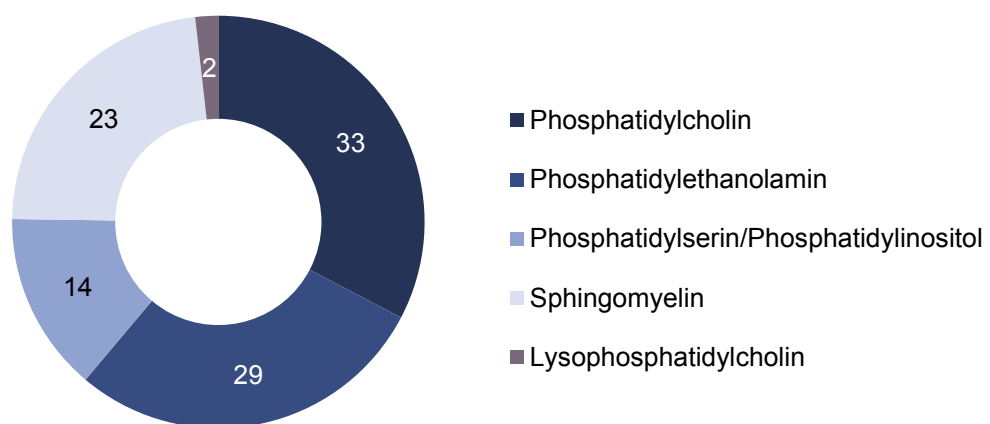
In Lebensmitteln sind PL ubiquitär vorhanden, aber in hohen Mengen in Eigelb, Fleisch, Soja sowie Schweine- und Hühnerleber zu finden. Eine weitere wichtige Quelle für PL



stellen die Milchprodukte dar (Zeisel *et al.* 2003, Küllenberg *et al.* 2012). Die PL der Sojabohne finden häufig als Emulgatoren in der Lebensmittelindustrie und als Nahrungsergänzungsmittel Verwendung, da sie reich an PL und leicht isolierbar sind. In 100 g getrockneten Sojabohnen sind etwa 1,8 g PL enthalten (Souci *et al.* 2008). In Pflanzen kommen Sphingolipide vor allem in Form von Cerebrosiden vor (Nilsson *et al.* 2003). Die Aufnahme von PL ist für den Menschen nicht essenziell.

#### 1.1.2.1 Phospholipide in der Kuhmilch

In der Milch sind PL für die Emulsion von Fett und Wasser verantwortlich und sind zu 60 % in der MilCHFettkügelchenmembran (*milk fat globule membrane*, MFGM) bzw. zu 40 % in der heterogenen Membran der fettfreien Milchfraktion lokalisiert (Keenan und Patton 1995). Die proteinhaltige Lipiddoppelschicht der MFGM zeigt mit der lipophilen Seite nach innen, wo sich Triglyceride (TG) und andere Fette befinden, die hydrophile Seite zeigt nach außen zur wässrigen Phase (Dewettinck *et al.* 2008). Bei der Produktion von Milchprodukten wird die MFGM aufgerissen, sodass die Membran zwar weiterhin aus PL und Proteinen bestehen bleibt, das Fett aber nicht mehr damit verbunden ist (Dewettinck *et al.* 2008). Die PL verbleiben so überwiegend in der wässrigen, proteinhaltigen Phase, wie z.B. in der Buttermilch (Dewettinck *et al.* 2008, Sánchez-Juanes *et al.* 2009). Die PL-Konzentration in der Kuhmilch, etwa 1 % aller Fette (33 mg/100 g Milch mit 3,5 % Fett), ist von verschiedenen Faktoren abhängig, wie der Laktationsphase, Fütterung oder Rasse der Kuh und der Jahreszeit (Bitman und Wood 1990, Souci *et al.* 2008).

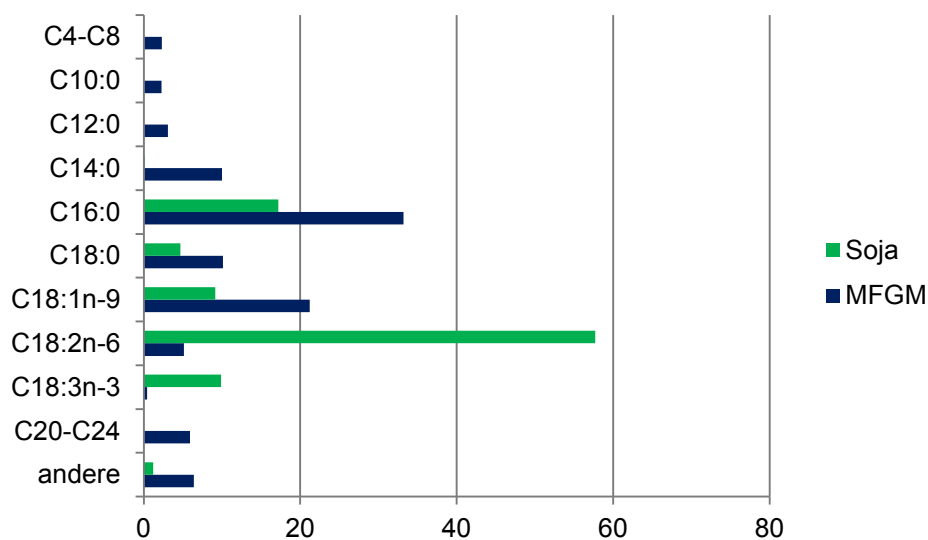


**Abbildung 3: Phospholipid-Verteilung der Milch.**

Angaben in Prozent, Daten von Sánchez-Juanes *et al.* (2009).

In Abbildung 3 ist die Verteilung der PL in Vollmilch dargestellt (Sánchez-Juanes *et al.* 2009). PE, PC und SM sind vorherrschend, zu geringeren Teilen sind PS und Phosphatidylinositol (PI) und weitere PL enthalten.

Die FS-Zusammensetzung der Milch-PL ist in Abbildung 4 dargestellt. MFGM enthalten etwa 67 % gesättigte FS, 26 % einfach ungesättigte FS und 7 % mehrfach ungesättigte FS (Lopez *et al.* 2008). Eine Besonderheit der MFGM-PL sind die besonders langkettigen FS, die aus 20 bis 24 C-Atomen bestehen und etwa 6 % aller FS ausmachen.

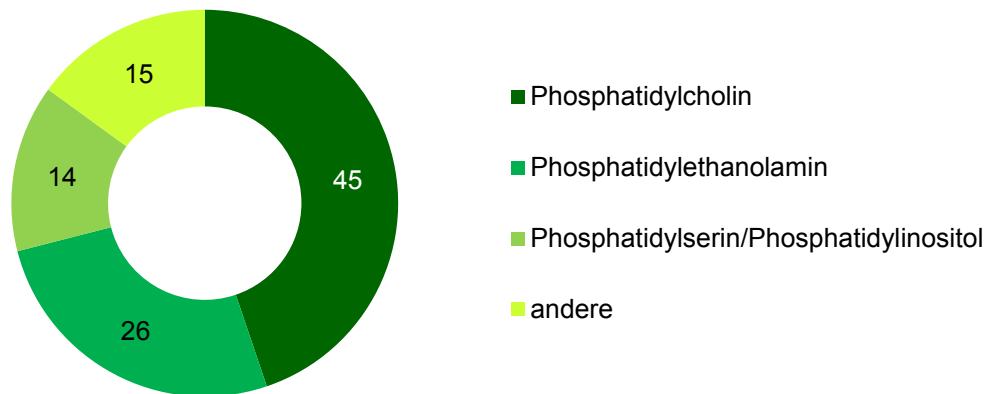


**Abbildung 4: Fettsäuremuster in den Phospholipiden der MilCHFettkügelchenmembran (MFGM) und Soja-Phospholipiden.**

Angaben in Prozent, Daten für Phospholipide der MFGM beziehen sich auf Fütterung der Kühe mit Maissilage. Daten von Lopez *et al.* (2008) bzw. Osthoff *et al.* (2010).

#### 1.1.2.2 Phospholipide in Sojaprodukten

Der höchste Anteil an PL in Sojabohnen ist 45 % PC, gefolgt von 26 % PE und 14 % PI (Souci *et al.* 2008), die Sojabohne enthält aber kein SM (s. Abbildung 5). Außerdem weisen die PL der Sojabohnen ein anderes FS-Muster auf als die PL der Milch (s. Abbildung 4), etwa 22 % der FS sind gesättigt, 9 % einfach ungesättigt und 68 % mehrfach ungesättigt (Osthoff *et al.* 2010).



**Abbildung 5: Phospholipid-Verteilung in der Sojabohne.**

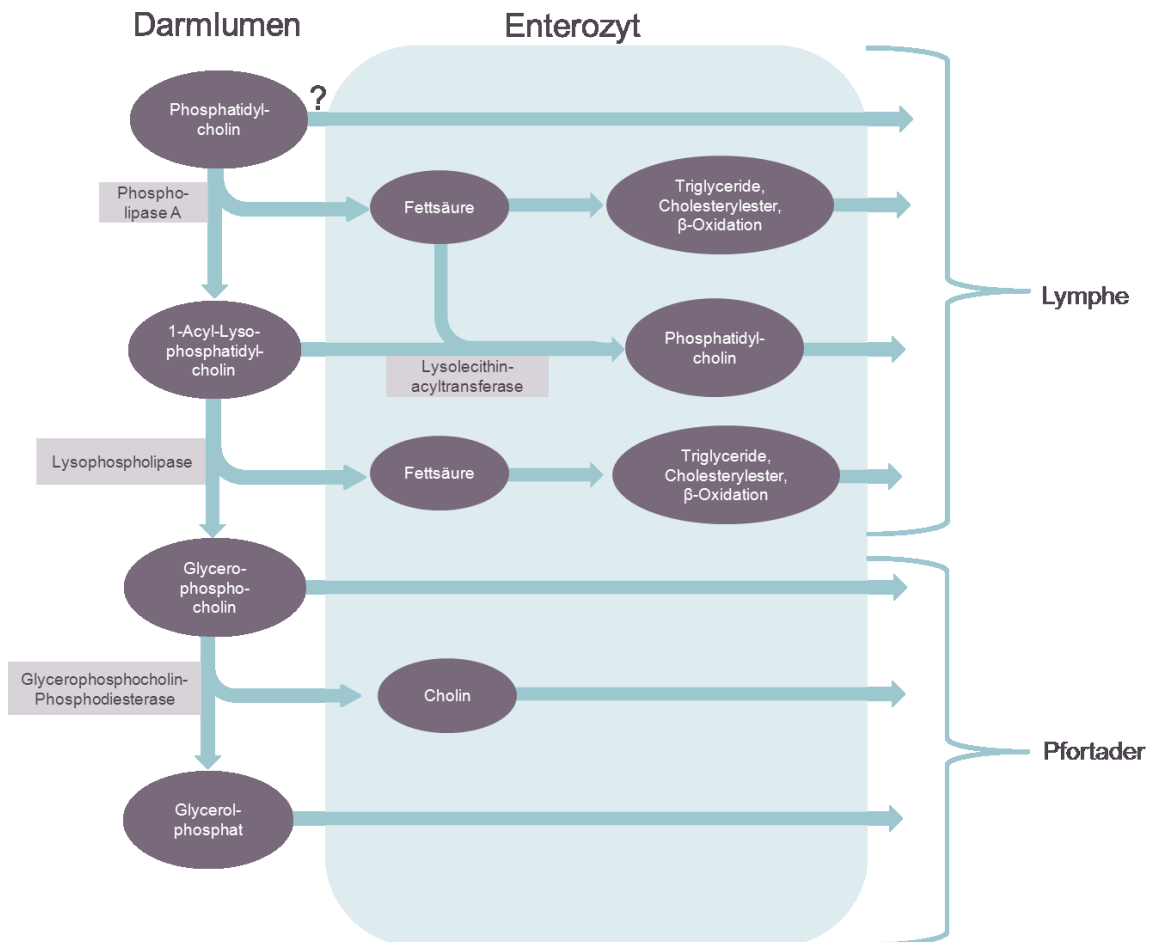
Angaben in Prozent, Daten von Souci *et al.* (2008).

### 1.1.3 Resorption von Phospholipiden

Die tägliche Aufnahme von PL über die Ernährung wird auf 2 bis 8 g (Cohn *et al.* 2010b) geschätzt, davon entfallen etwa 1 bis 2 g auf PC (Akesson 1982) und etwa 0,3 bis 0,4 g auf SM (Vesper *et al.* 1999). Zusätzlich werden endogen über die Galle 10 bis 20 g PL in das Dünndarmlumen ausgeschüttet (Cohn *et al.* 2010a), 95 % davon als PC (Alvaro *et al.* 1986). Der Verdau und die Resorption unterscheidet sich je nach PL, nachfolgend wird die Resorption von PC und SM beschrieben.

PC wird vorrangig im proximalen Dünndarm resorbiert, die Resorptionsrate liegt bei über 90 % (Zierenberg und Grundy 1982). Der erste Schritt besteht aus der Bildung gemischter Mizellen, die aus Gallensalzen, Phospholipiden, Acylglycerol, freien FS und Cholesterin bestehen (Senior 1964) (vgl. Abbildung 6). Etwa die Hälfte des PCs im Lumen wird durch das Enzym Phospholipase A2 aus dem Pankreassaft in FS und Lysophosphatidylcholin (LysoPC) gespalten. Die andere Hälfte des LysoPCs wird weiter durch die Lysophospholipase zu Glycerophosphocholin hydrolysiert (Le Kim und Betzing 1976). Ein kleiner Teil des PCs wird möglicherweise intakt resorbiert (Zierenberg und Grundy 1982). LysoPC wird nach der Resorption in den Enterozyten wieder zu PC verestert und für die Synthese von Chylomikronen genutzt, die in die Lymphe sezerniert werden. Die abgespaltenen FS werden als TG in die Lymphchylomikronen aufgenommen. Das Glycerophosphocholin bzw. die durch die Glycerophosphocholin-Phosphodiesterase entstandenen Spaltprodukte Glycerophosphat und Cholin werden, da wasserlöslich, über die Pfortader zur Leber transportiert (Le Kim und Betzing 1976). Nach Gabe von isotoopenmarkiertem PC treten die markierten Lipide im Plasma und in

Erythrozyten überwiegend in PC, aber auch in LysoPC, SM und deren FS in TG und Cholesterylestern auf, die Resorption ist nach etwa einem Tag abgeschlossen (Le Kim und Betzing 1976, Zierenberg und Grundy 1982).

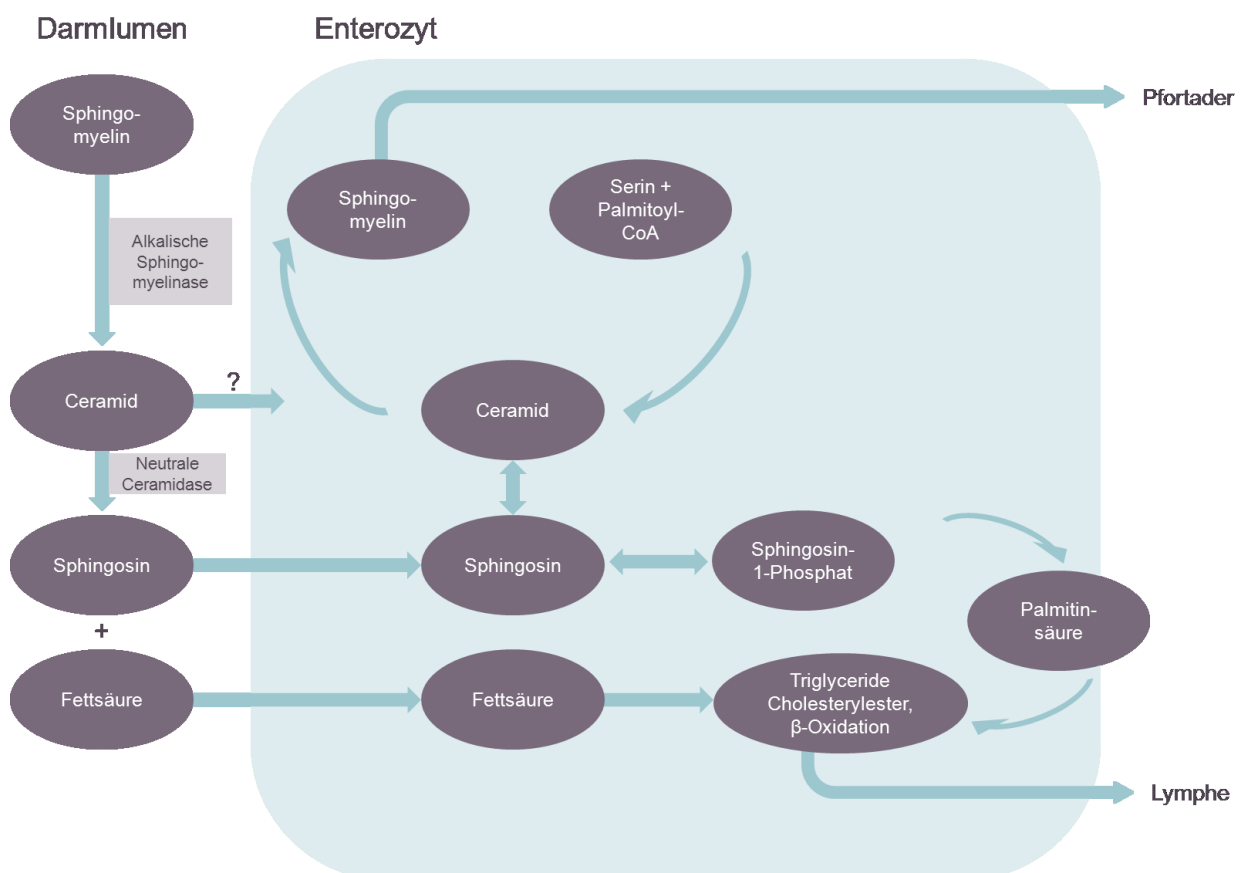


**Abbildung 6: Schema der Verdauung, Resorption und Stoffwechsel von Phosphatidylcholin im Enterozyten.**

Basierend auf Daten von Parthasarathy *et al.* (1974), Le Kim und Betzing (1976) und Zierenberg und Grundy (1982).

Über die Ernährung werden täglich etwa 300 mg Sphingolipide aufgenommen, von denen der größte Anteil SM darstellt (Nilsson *et al.* 2003). Die Resorption von SM unterscheidet sich von der Resorption von PC. Im Gegensatz zu TG und GPL ist die Verdauung der SM relativ langsam und unvollständig. Der SM-Verdau ist stark abhängig von der Menge des verzehrten SM, der Anwesenheit von Gallensalzen und weiteren Fetten sowie der Menge der an der SM-Verdauung beteiligten Enzyme (Nilsson und Duan 2006). Bei einer Gabe von 250 mg SM können etwa 80 % verdaut werden

(Ohlsson *et al.* 2010b). Als Initialschritt wird die Spaltung von SM in Ceramid und Phosphocholin angesehen, die durch die alkalische Sphingomyelinase katalysiert wird (Zhang *et al.* 2011b). Anschließend wird Ceramid durch die in der Bürstensaummembran lokalisierte neutrale Ceramidase in Sphingosin und freie FS hydrolysiert. Obwohl Sphingosin, wahrscheinlich über passive Diffusion und Transport durch die apikale Membran, leicht in den Enterozyten übergehen kann (Garmy *et al.* 2005a), können Ceramid und Sphingomyelin nicht oder nur in geringen Mengen resorbiert werden (vgl. Abbildung 7).



**Abbildung 7: Schema der Verdauung, Resorption und Stoffwechsel von Sphingomyelin im Enterozyten.**

Modifiziert nach Nilsson und Duan (2006).

Im Enterozyten werden die freien FS mit Glycerin zu TG verestert, das Sphingosin wird enzymatisch in Sphingosin-1-Phosphat und weiter zu Palmitinsäure umgesetzt. Die Palmitinsäure wird mit Glycerin zu TG verestert, die dann in Chylomikronen eingebaut und über die Lymphe transportiert werden. Daneben kann aus Sphingosin Ceramid und daraus SM gebildet werden. SM wird über Chylomikronen und *very low density*

*lipoprotein* (VLDL) ins Blut sezerniert. Im Plasma ist SM hauptsächlich in den Lipoproteinen zu finden. Plasma-SM befindet sich zu 63 bis 75 % in der *low density lipoprotein* (LDL)- und VLDL-Fraktion und zu 25 bis 37 % in der *high density lipoprotein* (HDL)-Fraktion. Die Hepatozyten sezernieren neu synthetisiertes SM und Ceramid in VLDL (Nilsson und Duan 2006).

## 1.2 Herz-Kreislauf-Erkrankungen

### 1.2.1 Definition von Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Unter Herz-Kreislauf-Erkrankungen (HKE) werden Erkrankungen verstanden, die das Herz und den Blutkreislauf betreffen. Sie sind in dem Kapitel IX, Krankheiten des Kreislaufsystems, der *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* (ICD) der *World Health Organization* (WHO) (ICD-10, I00-I99) zusammengefasst (WHO 2010b). Dazu werden unter anderem Hypertonie, ischämische Herzkrankheiten und zerebrovaskuläre Erkrankungen, arterielle Verschlusskrankheiten und rheumatisches Fieber gezählt. Die beiden häufigsten HKE sind koronare Herzerkrankungen (KHK) und Schlaganfall (Allender *et al.* 2008).

### 1.2.2 Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen

An HKE sterben weltweit die meisten Menschen (Strong *et al.* 2005, WHO 2011). Die Erkrankungen sind jährlich in 17,3 Mio. der Sterbefälle die Todesursache (WHO 2011), davon sind 7 Mio. durch KHK und 5,5 Mio. durch Schlaganfälle verursacht. Dazu kommen jährlich 5 Mio. neue Behinderungen durch nicht-letale Schlaganfälle (WHO 2011). Trotz dieser schon jetzt extrem hohen Inzidenz ist mit einer weiteren Zunahme von Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zu rechnen. Vor allem breiten sie sich in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen stark aus, wohingegen in Ländern mit hohem Einkommen durch vielfältige Präventionsmaßnahmen, frühzeitige Diagnosen sowie Behandlungen nur eine geringe Zunahme zu erwarten ist oder die Zahl der Erkrankungen schon gesunken ist (Strong *et al.* 2005, Abegunde *et al.* 2007, Strong *et al.* 2007, Hilbrich *et al.* 2007, Rayner *et al.* 2009).

Auch in Deutschland sind HKE die häufigste Todesursache und für etwa 40 % der Sterbefälle bei Frauen und 37 % bei Männern verantwortlich (Thefeld 2000, Robert Koch-Institut 2006, Robert Koch-Institut 2011). Die Behandlungskosten für HKE stehen dort mit 35,4 Mrd. Euro an erster Stelle im Gesundheitssystem (Statistisches Bundesamt 2004). Im Zusammenhang mit Hypertonie, zerebrovaskulären Krankheiten und ischämischen Herzkrankheiten entstehen jährlich Kosten von jeweils etwa 8 Mrd. Euro, auf die Herzinsuffizienz entfallen etwa 3 Mrd. Euro (Statistisches Bundesamt 2004).

### 1.2.3 Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Bedeutende Risikofaktoren für HKE sind Rauchen, Übergewicht oder Adipositas, körperliche Inaktivität, Hypertonie, Lipidstoffwechselstörungen, ungesunde Ernährung, hoher Alkoholkonsum und Diabetes mellitus (Robert Koch-Institut 2006, Lloyd-Jones *et al.* 2006, Allender *et al.* 2008). Die Risikofaktoren sind zum einen verhaltensbedingt und zum anderen metabolischer Art. Weiterhin gibt es Risikofaktoren, die sich nicht oder nur begrenzt beeinflussen lassen, dazu gehören u.a. Armut und niedriges Bildungsniveau, fortgeschrittenes Lebensalter, Geschlecht, genetische Prädispositionen und psychische Faktoren (v.a. Stress und Depression) (Robert Koch-Institut 2006, WHO 2011). Das Risiko eine HKE zu entwickeln ist abhängig von der Anzahl und Schwere der Risikofaktoren (Lloyd-Jones *et al.* 2006) bzw. der Anzahl an idealen oder schützenden Faktoren (Folsom *et al.* 2011).

### 1.2.4 Atherosklerose als pathologische Grundlage für Herzinfarkt und Schlaganfall

Der pathologische Prozess, dem Herzinfarkt und Schlaganfall vorausgeht, ist die Atherosklerose. Atherosklerose ist ein inflammatorischer Prozess, bei dem mittelgroße und große Blutgefäße des Herzkreislaufsystems betroffen sind (Ross 1999, Libby 2002, WHO 2011). Wenn das Endothel der Blutgefäße erhöhten LDL-Spiegeln und anderen atherogenen Substanzen wie freien Radikalen ausgesetzt ist, wird es durchlässig für Lymphozyten und Monozyten. Diese Zellen migrieren in die unteren Schichten (*deep layers*) der Blutgefäßwand, wodurch eine Reaktionskette ausgelöst wird. Weitere LDL-Partikel werden angezogen und von Monozyten phagozytiert. Schaumzellen entwickeln sich aus Makrophagen und glatten Muskelzellen. Später entsteht eine fibröse Kappe, die aus glatten Muskelzellen und Kollagen besteht. Zur gleichen Zeit beginnen die Makrophagen abzusterben, wodurch ein nekrotischer Kern innerhalb der fibrösen

Kappe entsteht. Diese Läsionen, atherogene Plaques genannt, werden größer, indem u.a. Zellen, Lipide, Fibrin und Kollagen akkumulieren, woraufhin eine Wölbung nach außen in das Gefäßlumen entsteht (Glass und Witztum 2001). Im weitergehenden Prozess wird die fibröse Kappe dünn und rissig und kann aufplatzen. Indem die Plaque aufplatzt, werden Lipidfragmente und Zelltrümmer in das Gefäßlumen ausgeschüttet, und die Schäden im Endothel führen zu thrombotischen Reaktionen. Bei komplettem Verschluss von koronaren oder zerebralen Blutgefäßen kommt es zum Herzinfarkt oder Schlaganfall (WHO 2011).

### 1.3 Phospholipide und deren Bedeutung für Herz-Kreislauf-Erkrankungen

#### 1.3.1 Wirkung von Phospholipiden auf den Lipidstoffwechsel

Lipidstoffwechselstörungen gehören zu den Hauptrisikofaktoren für HKE (WHO 2011). Es gibt eine überzeugende Evidenz, dass erhöhte LDL-Cholesterin (C) -Konzentrationen im Plasma das Risiko für KHK erhöhen (Castelli 1990, Grundy *et al.* 2004). Bei der Gesamt-C-Konzentration besteht eine positive loglineare Beziehung zum Relativen Inzidenzrisiko für KHK sowie zur KHK-Mortalität schon ab 160 mg/dl (Stamler und Neaton 2008). Hohe HDL-C-Spiegel wirken sich hingegen kardioprotektiv aus (Gordon *et al.* 1977, Miller *et al.* 1992, Singh *et al.* 2007). Das Verhältnis von Gesamt-C zu HDL-C gilt als bester Prädiktor für verschiedene HKE wie ischämische Herzerkrankungen (Lemieux *et al.* 2001, Ridker *et al.* 2001, Lewington *et al.* 2007, Millan *et al.* 2009). Weiterhin gilt die Lipoprotein a (Lp (a)) –Konzentration als guter Prädiktor für das Risiko von KHK (Seman *et al.* 1999) und die Gesamtsterblichkeit (Genser *et al.* 2011). Diskutiert wird außerdem ein inverser Zusammenhang zwischen Apolipoprotein (Apo) A1 und dem Risiko für HKE (Stampfer *et al.* 1991, Ballantyne und Hoogeveen 2003) und ein positiver Zusammenhang zwischen Apo B und dem Risiko für HKE (Sharrett *et al.* 2001, Ingelsson *et al.* 2007).

In Deutschland hat jede/r dritte Erwachsene zu hohe Cholesterinspiegel (Thefeld 2000). Als wichtigster Zielparameter gilt das LDL-C, welches durch Medikamente wie Statine und Ezetimibe gesenkt werden kann. Statine sind kompetitive Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA)-Reduktase, die das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Cholesterinbiosynthese darstellt (Lindgren *et al.* 1985,



Grundy 1988). Statine können das LDL-C um etwa 25 – 45 % senken (Grundy *et al.* 2004, Pande 2012). Eine neuere Medikamentenfamilie stellen die Ezetimibe dar, 2-Azetidinon-Verbindungen, welche die C-Resorption senken, indem der intestinalen Steroltransporter Niemann-Pick C1-Like1 gehemmt wird (Davis *et al.* 2011). Ezetimibe können als Monotherapie gegeben das LDL-C um bis zu 20 % senken (Pandor *et al.* 2009), zusammen mit Statinen sogar um zusätzliche 25 % (Mikhailidis *et al.* 2007), sodass in einer kombinierten Ezetimibe-Statin-Therapie häufiger das Therapie-Ziel von  $\text{LDL-C} < 2,6 \text{ mmol/l}$  (entspricht 100,54 mg/dl) erreicht wird (Mikhailidis *et al.* 2011).

Seit einigen Jahren sind wieder vermehrt Lebensmittel und Lebensmittelinhaltsstoffe mit dem Potential, die intestinale C-Resorption zu hemmen, in den Fokus gerückt. Dazu gehören Pflanzensterole, lösliche Ballaststoffe, Saponine, Stearinsäure und Sojaprotein (Carr und Jesch 2006). Sie beeinträchtigen die intestinale Cholesterin- und Gallensäureaufnahme und können Plasma- und LDL-C-Konzentrationen senken. Auch für verschiedene PL-Klassen wurde eine Inhibierung der C-Resorption gezeigt (Carr und Jesch 2006, Cohn *et al.* 2010a).

#### 1.3.1.1 Hemmung der intestinalen Cholesterinresorption durch Phospholipide

PL sind nicht nur unerlässlich für die intestinale TG- und C-Resorption im Menschen, sondern können die C-Resorption ebenso hemmen (Carr und Jesch 2006, Cohn *et al.* 2010a, Cohn *et al.* 2010b). Rampone (1973) untersuchte die Dosis-Wirkungs-Beziehung von Leberlecithin auf die C-Resorption in einem *in vitro* Versuch mit präparierten Rattenintestinaldärmen und zeigte, dass die Resorption schon ab 0,13 mmol/l Lecithin gehemmt wird, und das Maximum der Hemmung bei 0,8 mmol/l erreicht wird.

In *in vivo* Versuchen mit Ratten führte eine intraduodenale Infusion von Soja-PC im Vergleich zu Distelöl zu einer verminderten C-Resorption (Beil und Grundy 1980). In einer Humanstudie war die C-Resorption während einer fünföchigen Intervention mit täglich 10 g Soja-PC geringer als bei der Gabe von 7 g Distelöl als Kontrolle (Kesaniemi und Grundy 1986). Daneben wurde für PC gezeigt, dass die Inhibierung abhängig von den gebundenen FS sein kann. So wurde die C-Resorption in präparierten Rattenintestinaldärmen durch Dipalmitoyl-PC stärker gehemmt als durch Dilinoleoyl-PC (Rodgers und O'Connor 1975). In einer Rattenstudie bewirkte 1,2-Dioleoyl-PC eine stärkere Inhibierung der Resorption als LysoPC (Koo und Noh 2001). In einem weiteren *in vivo* Versuch an Ratten wurde für Ei-PC und noch ausgeprägter für hydriertes Ei-PC eine Hemmung der C-Resorption gezeigt, nicht aber für Soja-PC (Jiang *et al.* 2001). So wird postuliert, dass mit steigendem Sättigungsgrad und zunehmender Länge der

Kohlenstoffkette der FS weniger C resorbiert werden kann. Eine Erklärung könnte sein, dass gesättigte FS als Substrate für die Phospholipase A2 weniger zugänglich sind als ungesättigte FS und dadurch die Bildung der Mizellen behindert wird (Küllenberg *et al.* 2012).

Wie Tierstudien gezeigt haben inhibiert auch SM die C-Resorption dosisabhängig (Nyberg *et al.* 2000, Eckhardt *et al.* 2002, Noh und Koo 2003). Wie Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen suggerieren, hemmt Sphingosin die NPC1L1-vermittelte C-Resorption (Garmy *et al.* 2005b).

Die Hemmung der C-Resorption ist dabei offensichtlich abhängig von der SM-Quelle, da in weiteren Tierstudien gezeigt wurde, dass Milch-SM effektiver die Aufnahme hemmt als Ei-SM (Noh und Koo 2004). Dies suggeriert, dass der höhere Sättigungsgrad der FS sowie die längeren FS in Milch-SM wichtige Einflussfaktoren auf die Inhibierung darstellen (Carr und Jesch 2006).

Daneben gibt es Hinweise, dass SM die C-Resorption stärker hemmen kann als die gleiche Menge PC (Carr und Jesch 2006). In einem *in vitro* Versuch akkumulierten Caco-2-Zellen, die mit Milch-SM inkubiert wurden, weniger Cholesterin als Zellen, die mit Eigelb-PC inkubiert wurden (Eckhardt *et al.* 2002). Eine Studie an Ratten zeigte ebenfalls, dass Milch-SM in gleichem molaren Verhältnis gegeben wie Soja-PC, hydriertes PC oder Dioleoyl-PC stärker die C-Resorption hemmt (Nyberg *et al.* 2000). In Tierexperimenten an der Maus wurde die C-Resorption durch Milch-SM und Dipalmitoylphosphatidylcholin dosisabhängig um bis zu 80 % gesenkt, nicht aber durch Eigelb-PC (Eckhardt *et al.* 2002).

Für die Inhibierung der intestinalen C-Resorption durch PL werden drei Mechanismen postuliert. Erstens könnte eine hohe PL-Menge im Darm eine effiziente mizellare PL-Hydrolyse behindern, welche die Voraussetzung für eine effiziente Cholesterinaufnahme ist. Zweitens könnten PL die physiochemischen Eigenschaften der gemischten Mizellen erhöhen, wie Größe, Zusammensetzung und biologische Eigenschaften, woraus eine geringere C-Resorption resultiert. Drittens könnten PL auf die Membraneigenschaften der Enterozyten und somit auch auf deren Cholesterintransporter wirken (Cohn *et al.* 2010b).

### 1.3.1.2 Wirkung der Phospholipide auf den Lipidstoffwechsel

#### Tierstudien

In zahlreichen Tierstudien wurde die Wirkung von PL auf den Lipidstoffwechsel untersucht. Dabei unterschieden sich die Studien in der Dauer, der verabreichten PL-Menge und PL-Klasse, dem Tiermodell und dem Studiendesign. Die Ergebnisse sind entsprechend heterogen, wie nachfolgend beschrieben wird.

In einer Studie von Jimenez *et al.* (1990) hatten Ratten nach 30 Tagen mit einem 2,5 %igen Soja-Lecithin-Futter niedrigere Gesamt-C-Konzentrationen und dazu niedrigere Cholesterinkonzentrationen in den VLDL als Ratten mit einem 0,7 %igen Soja-Lecithin-Futter. Auf weitere Lipidparameter hatte das Futter aber keinen Einfluss. Auch bei Hamstern, die mit einem cholesterinreichen Futter gefüttert wurden, hatte die Gruppe mit 3,4 % Soja-Lecithin im Futter geringere Konzentrationen an Gesamt-C, nicht-HDL-C, nicht-HDL-C/HDL-C und TG, resultierend in weniger atherosklerotischen Veränderungen (*fatty streaks*) im Vergleich zu den Kontrolltieren (1,4 % Sojaöl) (Wilson *et al.* 1998). Die gleiche Arbeitsgruppe führte Fütterungsversuche mit Affen durch, die ein Futter bekamen, dem 3,4 % Soja-Lecithin zugesetzt wurde bzw. ein Kontrollfutter ohne Lecithin. Soja-Lecithin senkte im Vergleich zur Kontrolle die Gesamt-C- und nicht-HDL-C-Konzentration um 32 bzw. 45 %. Auf HDL-C und TG hatte die Fütterungsintervention keinen Einfluss (Wilson *et al.* 1998). Im Gegensatz dazu zeigte aber bei Sprague-Dawley-Ratten eine zweiwöchige Fütterung mit Lecithin (enthielt 4,4 % PL) einen Anstieg von Gesamt-C, freiem und verestertem Cholesterin sowie LDL-C und eine Abnahme von VLDL-C im Vergleich zu einem Kontrollfutter mit gleichem Fettgehalt (LeBlanc *et al.* 2003). Bei einer viel niedrigeren Gabe von 0,05 % SM (Quelle nicht angegeben) über vier Wochen bei Mäusen wurde hingegen kein Einfluss auf Gesamt-C, TG, HDL-C, Gesamt-C/HDL-C im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt (Barrenetxe *et al.* 2006).

Daneben gibt es *in vivo* Studien, die den Einfluss verschiedener PL-Klassen auf den Lipidstoffwechsel vergleichen. In einer Studie wurde Futter mit 2 % Soja-PC bzw. Soja-PE angereichert und Ratten über einen Zeitraum von 15 bis 18 Tagen damit gefüttert. Soja-PE bewirkte eine Reduktion der Cholesterylester, PL und Apo A1 und eine Zunahme von Apo B im Vergleich zur Soja-PC-Gruppe. In einem weiteren Experiment zeigte eine Fütterung mit 2 % Soja-PE bzw. 2 % Soja-PC plus Ethanolamin keine unterschiedlichen Effekte auf den Lipidstoffwechsel (Imaizumi *et al.* 1983). Murata *et al.* (1982) reicherten Futter mit den PL-Basen Cholin, Ethanolamin und Inositol an und fütterten damit Ratten über einen Zeitraum von 14 Tagen. Dabei bewirkte Ethanolamin eine Abnahme der Konzentrationen von Cholesterin, Apo A1 und eine Zunahme von

Apo B im Serum, wobei nur die Abnahme von Cholesterin einen wünschenswerten Effekt darstellt. Die Autoren postulieren, dass PE für die Veränderungen im Serumlipoproteinprofil verantwortlich ist.

LeBlanc *et al.* (1998) untersuchten, welche Rolle das Cholin bei der Wirkung von Lecithin auf den Lipidstoffwechsel spielt. Dazu bekamen Ratten über zwei Wochen ein Kontrollfutter, ein cholinangereichertes Futter (4 %) oder ein Soja-Lecithinangereichertes Futter (20 %). Das cholinangereicherte Futter führte zwar zu Reduktionen von HDL-C, Gesamt-C und TG, diese waren aber im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant. Nur in der Lecithin-Gruppe wurden signifikant niedrigere HDL-C- (nach 7 und 14 Tagen) und Gesamt-C-Konzentrationen (nach 14 Tagen) und höhere TG-Spiegel (nach 7 Tagen), aber kein verändertes Verhältnis von Gesamt-C/HDL-C beobachtet. Letztendlich können für den Lecithin-Effekt auf den Lipidstoffwechsel neben dem intakten Cholin anstelle der Kopfgruppe Cholin auch das darin enthaltene PE sowie Mikrokomponenten wie Pflanzensterole verantwortlich sein (LeBlanc *et al.* 1998).

Außerdem gibt es Hinweise, dass neben den PL-Klassen auch die FS der Phospholipide, je nach Sättigungsgrad, unterschiedliche Wirkungen auf den Lipidstoffwechsel ausüben. So zeigten Navab *et al.* (2003), dass die Gabe von 0,1 % 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DMPC) bei ApoE-null Mäusen sowohl die Apo A1-Synthese als auch die Konzentrationen an Apo A1 und HDL-C im Plasma im Vergleich zu äquivalenten Mengen an Eigelb-Lecithin oder Soja-Lecithin erhöht. Die DMPC-gefütterten Mäuse wiesen außerdem weniger Läsionen der Aorta auf als die Vergleichstiere. Distel-PL haben nach einer vierwöchigen Fütterungsstudie bei Ratten im Gegensatz zu Soja-PL, die einen noch höheren Anteil an mehrfach ungesättigten FS enthalten, das HDL-Cholesterin im Plasma erhöht (Iwata *et al.* 1992). Allerdings können dafür auch die Unterschiede im PL-Muster, d.h. die gebundene Kopfgruppe der PL von Soja und Distel verantwortlich sein. In einer Rattenstudie von Murata *et al.* (1982) bewirkte ein Futter angereichert mit 4 % Soja-Lecithin (über 70 % mehrfach ungesättigte FS) oder hydriertem Soja-Lecithin (keine mehrfach ungesättigten FS) über 8 Tage keine Unterschiede bei den untersuchten Lipidparametern. Eigelb-Lecithin (4 %) senkte Gesamt-C, Apo A1 und erhöhte Apo B. Obwohl sich die Fettsäuremuster der Futter unterschieden, machen die Autoren für diesen Effekt nur das in Eigelb-PC enthaltene Ethanolamin verantwortlich.

## Mechanismen

Verschiedene Mechanismen können für die Wirkung der PL auf die Plasma-Lipide verantwortlich sein. Zum einen können sie, wie oben beschrieben, die C-Resorption hemmen, und zum anderen direkt in den endogenen Lipidstoffwechsel eingreifen. Denkbar wäre eine Hemmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität. Ratten, deren Futter 2 % Soja-PI und 5 % Sojaöl enthielt, hatten nach 4 Wochen eine um 19 % geringere Gesamt-C-Konzentration im Vergleich zu den Kontrolltieren, deren Futter 7 % Sojaöl enthielt. Die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wurde jedoch nicht beeinflusst (Shirouchi *et al.* 2008). In einer anderen Rattenstudie wurde gezeigt, dass trotz erhöhter hepatischer HMG-CoA-Reduktase-Aktivität durch PE-Fütterung niedrigere Gesamt-C-Konzentrationen als in Vergleichsgruppen erreicht wurden (Imaizumi *et al.* 1983). Auch in Hennen wurde durch Distel-PL die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität erhöht, aber das Gesamt-C im Vergleich zu Rindertalg gesenkt. Diese Studien weisen darauf hin, dass der cholesterinsenkende Effekt nicht auf eine verringerte Cholesterinbiosynthese zurückzuführen ist. Möglicherweise wird eine verminderte C-Resorption zum Teil durch eine erhöhte Eigensynthese kompensiert.

Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), ein Enzym das in der Leber synthetisiert und ins Plasma ausgeschüttet wird, bildet aus PC und Cholesterin Cholesterinester und Lyso-PC an der Oberfläche von HDL und LDL. Die Cholesterinester werden dann wieder zur Leber transportiert (Clay *et al.* 2000). Die LCAT-Aktivität und HDL-C im Plasma wurde in einer Studie von Iwata *et al.* (1993) durch PL (Distel-PL, Soja-PL, Eigelb-PL) im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Auch Jimenez *et al.* (1990) beobachteten einen Anstieg der LCAT-Aktivität, wohingegen bei Polichetti *et al.* (2000) eine Abnahme zu verzeichnen war. Eine neue Studie zeigt, dass offensichtlich das Verhältnis von SM/PC im Serum die LCAT-Aktivität beeinflusst, je höher der Quotient, desto geringer ist die LCAT-Aktivität im Plasma (Subbaiah *et al.* 2012).

Außerdem könnte auch ein Einfluss der PL auf Apolipoproteine und somit auf den Cholesterintransport im Plasma bestehen. Wang *et al.* (2001) zeigten an neugeborenen Schweinen, dass 0,1 % Soja-PC im Futter im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne PC die intestinale Apo A1 Synthese hochreguliert, wodurch Apo A1 im Plasma leicht, aber nicht signifikant erhöht vorlag. Keine signifikanten Unterschiede wurden bei Gesamt-C, TG, HDL-C, PL und Apo B in Plasma beobachtet. Dagegen zeigten Imaizumi *et al.* (1982) in einer 2 bis 3-wöchigen Intervention, dass ein Futter mit 10 %igem Soja-PL-Gehalt im Vergleich zu einem Futter mit 10 % Soja-Öl die Apo A1-Spiegel erniedrigt und Apo B erhöht. Auch in der Rattenstudie von Murata *et al.* (1983) bewirkte eine Fütterung mit

10 % Soja-PL geringere Apo A1-Anteile im Leberperfusat als die Kontrolle. In Mäusen, denen DMPC (0,2 mg/kg KG) intravenös injiziert wurden, wurde nach ein und zwei Stunden eine Abnahme der Lipoprotein (a) (Lp(a))-Konzentration um 15 bis 20 % beobachtet, diese Abnahme unterschied sich signifikant zur Kontrollgruppe. Nach vier und acht Stunden war kein Unterschied mehr feststellbar (Wang *et al.* 2009).

Im Allgemeinen zeigen diese und andere Tierstudien häufig eine Abnahme von ApoA1 (Murata *et al.* 1982, Imaizumi *et al.* 1983, Wat *et al.* 2009) und HDL-C (Imaizumi *et al.* 1983, Jimenez *et al.* 1990, Iwata *et al.* 1992, Müller *et al.* 2004), und eine Zunahme von Apo B (Murata *et al.* 1982, Imaizumi *et al.* 1983). Da aber niedrige HDL-C- und ApoA1-Spiegel und hohe Apo B-Spiegel als atherogen gelten (vgl. Abschnitt 1.3.1), sind diese Effekte negativ. Sehr häufig hingegen wurde eine Abnahme von Gesamt-C beobachtet. Dieser wünschenswerte Effekt war in einigen Studien durch die Abnahme des HDL-C mitbedingt (Imaizumi *et al.* 1983, Jimenez *et al.* 1990, LeBlanc *et al.* 1998, Müller *et al.* 2004), wodurch das Verhältnis Gesamt-C/HDL-C nicht positiv beeinflusst wurde. In anderen wurde jedoch Gesamt-C gesenkt, HDL-C blieb unverändert (Wilson *et al.* 1998, Watanabe *et al.* 2011). Auch bei Yunoki *et al.* (2010) war die Abnahme des Gesamt-C auf eine Senkung der nicht-HDL-Fraktion zurückzuführen, was auf eine schützende Wirkung der PL auf das HKE-Risiko schließen lässt.

## Humanstudien

Bereits vor über 20 Jahren bemängelten Knuiman *et al.* (1989), dass die meisten der bis *dato* durchgeführten Humanstudien über die Wirkung von Lecithin eine geringe Aussagekraft hatten. Meist wurden die Studien nicht mit einem Öl kontrolliert, welches ein ähnliches FS-Muster wie Lecithin aufweist und zudem häufig mit einer zu geringen Probandenzahl durchgeführt. Aus den vier kontrollierten Studien (Greten *et al.* 1980, Childs *et al.* 1981, Prack *et al.* 1983, Kesaniemi und Grundy 1986) schlussfolgerten sie, dass die hypocholesterinämischen Effekte von Lecithin Artefakte waren, die auf die Wirkung der in Lecithin vorkommenden Linolsäure zurückzuführen sind. Inzwischen gibt es weitere Humanstudien, die z.T. ein valides Studiendesign aufweisen.

Mourad *et al.* (2010) gaben Probanden über einen Zeitraum von zwei Monaten täglich 500 mg Soja-Lecithin bzw. 500 mg Sojaöl. Sie konnten keine Änderung von Gesamt-C, VLDL-C, LDL-C und HDL-C in der Kontrollgruppe beobachten, aber eine geringe



Abnahme von Gesamt-C und eine deutliche Abnahme von LDL-C (beides signifikant) in der Soja-Lecithin-Gruppe. Keine Änderung wurde bei VLDL-C und HDL-C in der Soja-Lecithin-Gruppe festgestellt. Diese Studie war allerdings nicht randomisiert und nicht verblindet, und es wurde kein direkter statistischer Vergleich zwischen den Interventionsgruppen durchgeführt.

In einer weiteren Studie wurden Sojapräparate an hypercholesterinämische Patienten während des Abendessens verabreicht. In der Studie wurde Wasser (200 ml), das mit 20 g Sojapräparat angereichert wurde und 1,2 g Soja-Lecithin enthielt, über 24 Wochen gegeben. Es wurde eine Abnahme der Gesamt-C (18 %), TG (35 %), LDL (32 %) und eine Zunahme von HDL-C (10 %) beobachtet (Ristic Medic *et al.* 2003). In einer zweiten Studie mit Diabetikern bekamen diese über 12 Wochen 15 g Sojapräparat (1,8 g Soja-Lecithin). Auch hier wurde eine Abnahme der Gesamt-C (12 %), TG (22 %), LDL-C (16 %), Gesamt-C/HDL-C (21 %), LDL-C/HDL-C (25 %) und Zunahme von HDL-C (11 %) beobachtet (Ristic Medic *et al.* 2006). Beide Studien waren nicht kontrolliert, sodass nicht klar ist, ob diese Effekte auf PL oder auf andere Bestandteile im Sojapräparat zurückzuführen sind, oder lediglich Studieneffekte darstellen.

In einer randomisierten und kontrollierten *Cross-Over*-Studie (Ohlsson *et al.* 2010a) zeigte die einmalige Gabe von 2,8 g Milch-PL vor einem Frühstück keine signifikanten Interventionseffekte auf postprandiale Blutlipidkonzentrationen im Vergleich zu 2,7 g Ei-PL. Auch die Gabe der gleichen Menge Milch-Sphingolipide über vier Wochen in einer kontrollierten Studie gab es keine signifikanten Interventionseffekte auf den Lipidstoffwechsel im Vergleich zu Ei-PL (Ohlsson *et al.* 2009).

Oosthuizen *et al.* (1998) gaben Männern in einer doppelblinden Studie über vier Wochen täglich entweder 175 g Joghurt (Kontrolle), oder 175 g Joghurt, der mit 20 g Soja-Lecithin oder 17 g Sojaöl als FS-Kontrolle angereichert wurde. Soja-Lecithin hatte im Vergleich zu den Kontrollgruppen keinen Effekt auf Gesamt-C, TG, HDL-C, LDL-C, LDL-C/HDL-C und Apo A1. Nach zwei Wochen waren innerhalb der Soja-Lecithin-Gruppe Apo B und Lp(a)-Spiegel signifikant erhöht, lagen aber nach vier Wochen wieder beim Ausgangswert und unterschieden sich nicht von den Kontrollgruppen.

O'Brien und Andrews (1993) gaben Männern über 6 Wochen täglich 15 g Ei-PL oder Soja-PL bzw. 12 g TG mit einem dem Ei- bzw. Soja-Lecithin vergleichbarem FS-Muster in Kapseln. In dieser nicht-randomisierten *Cross-Over*-Studie konnten keine Interventionseffekte für HDL-C, TG, Apo A1 und Apo B festgestellt werden. Ei-Lecithin erhöhte sogar das Plasma-Gesamt-C im Vergleich zu den weiteren Interventionsgruppen.

In einer vierwöchigen randomisierten, doppelblinden und kontrollierten *Cross-Over*-Studie wurde Männern täglich 1 g Phytosphingosin oder ein Placebo in Kapseln verabreicht. Phytosphingosin senkte Gesamt-C, LDL-C und das Verhältnis von Gesamt-C/HDL-C im Vergleich zum Placebo (Snel *et al.* 2010). Bei dem verabreichten Phytosphingosin handelt es sich wahrscheinlich um ein Sphingosin, die Quelle ist unbekannt und das Produkt ist nicht näher charakterisiert. Ein Vergleich der Wirkung dieses Produkts mit der Wirkung anderer Produkte ist nicht möglich.

In einer randomisierten und kontrollierten Studie bekamen Männer und Frauen täglich 2,8 oder 5,6 g PL aus Soja, entweder zu einem Frühstück, oder ohne Frühstück. Durch dieses Design wurde gezeigt, dass PL den größeren Effekt bei der Gabe zu einer Mahlzeit haben. Nach zwei Wochen stieg durch die Gabe von 5,6 g PL mit Frühstück das HDL-C um 18 % an, dieser Anstieg war im Vergleich zu den Veränderungen in der Gruppe mit 2,8 g PL ohne Frühstück (0,4 %) und der Gruppe mit 5,6 g ohne Frühstück (4,0 %) signifikant. Der Anstieg des Plasma-HDL-C in der Gruppe mit 2,8 g PL mit Frühstück (13 %) war gegenüber der Gruppe mit 2,8 g PL ohne Frühstück signifikant. Eine Kontrolle mit einem Öl mit vergleichbarem FS-Spektrum wurde nicht durchgeführt (Burgess *et al.* 2005). Die Studie war nur von geringer Dauer (2 Wochen) und die Gruppengröße betrug z.T. nur 3 Personen, außerdem wurde die statistische Auswertung nicht mit einer zweifaktoriellen ANOVA durchgeführt, sodass der Einfluss der PL-Menge und der Verabreichung mit oder ohne Mahlzeit nicht getrennt betrachtet werden kann, und die Interpretation der Ergebnisse schwierig ist.

Die Datenlage aus *in vitro* Versuchen und Tierstudien gibt Hinweise (siehe oben), dass PL mit einem hohen Anteil an SM (fast 20 %) und einem hohen Anteil an gesättigten FS die C-Resorption aus dem Darm stärker hemmen können als PL, die kein SM enthalten und einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten FS haben. Zusätzlich können PL mit gesättigten FS einen stärkeren Einfluss auf den intermediären Lipidstoffwechsel ausüben, indem sie einen stärkeren Anstieg an Apo A1 und HDL als mehrfach ungesättigte FS bewirken (Navab *et al.* 2003). Wie in Kapitel 1.1.2.1 und 1.1.2.2 beschrieben, haben Milch-PL einen hohen Anteil an SM (fast 20 %) und einen hohen Anteil an gesättigten FS, wohingegen Soja-PL kein SM enthalten und einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten FS aufweisen. Auch neuere Humanstudien sind z.T. in der Qualität des Studiendesign, nicht ausreichend (O'Brien und Andrews 1993, Ristic Medic *et al.* 2003, Ristic Medic *et al.* 2006, Mourad *et al.* 2010), um eine abschließende Beurteilung der Wirkung der PL zu ermöglichen. Dass die Ergebnisse verschiedener Studien sich unterscheiden, ist möglicherweise auf diesen Aspekt zurückzuführen. Außer den Studien von Ohlsson *et al.* (2009, 2010a), die mit Ei-PL kontrolliert wurden, gibt es



bisher keine weiteren Studien über die Wirkung von Milch-PL. Deshalb sind Studien wichtig, in denen die Wirkung von Milch-PL im Vergleich zu Milch-TG mit ähnlichem FS-Muster und mit PL mit einem hohen Anteil an mehrfach ungesättigten FS wie Soja-PL geprüft wird.

### 1.3.2 Wirkung von Phospholipiden auf den Homocysteinspiegel und Glutathionstatus

Oxidative Prozesse spielen bei der Pathogenese von Atherosklerose eine wichtige Rolle (Lönn *et al.* 2012). Als wichtiges niedermolekulares Antioxidans ist die Konzentration des Glutathions (GSH) im Blut invers mit Atherosklerose assoziiert (Schutte *et al.* 2009).

Als weiterer unabhängiger Risikofaktor für HKE gilt Hyperhomocysteinämie und kann für 10 % des Gesamtrisikos verantwortlich gemacht werden. Steigt die Homocysteinkonzentration über 10  $\mu\text{mol/l}$ , besteht eine lineare Beziehung zwischen der Homocysteinkonzentration und kardiovaskulären Erkrankungen sowie der Gesamtmortalität. Ein günstiger Homocysteinbereich liegt unter 10  $\mu\text{mol/l}$  vor, ein Bereich zwischen 10 und 12  $\mu\text{mol/l}$  wird bei Gesunden toleriert. Bei Patienten mit weiteren HKE-Risikoparametern besteht Handlungsbedarf. Eine moderate Hyperhomocysteinämie zwischen 12 und 30  $\mu\text{mol/l}$  sollte bei Gesunden und Patienten behandelt werden (Stanger *et al.* 2003). Wie ein Review zeigt (Marti-Carvajal *et al.* 2009), wirken sich allerdings Interventionen mit den B-Vitaminen Cyanocobalamin (B12), Folsäure (B9) und Pyridoxin (B6) zur Senkung des Homocysteinspiegels auf das Auftreten von letalen und nichtletalen Herzinfarkten, Schlaganfällen oder anderen Todesursachen nicht aus.

In einem zugelassenen Health-Claim der EFSA (2011) wurde bereits die Funktion des Cholins für einen normalen Homocysteinmetabolismus bestätigt. PC und SM können möglicherweise durch die Bereitstellung von Cholin eine Wirkung auf Homocystein und GSH ausüben, da der Stoffwechselweg von Cholin mit dem Methionin- und Homocysteinstoffwechsel eng verbunden ist (siehe Abbildung 8). Der Bedarf von Cholin wird sowohl über die Ernährung als auch durch die *de novo* Synthese von PC durch das Enzym Phosphatidylethanolamin-N-Transferase (PEMT) gedeckt (Fischer *et al.* 2010). Cholin gilt als essenzieller Nährstoff (Zeisel *et al.* 1991) in den USA, die Zufuhrempfehlung für Männer liegt dort bei 550 mg/d (American Institute of Medicine 2000). In Deutschland, Österreich und Schweiz hingegen gibt es keine Zufuhrempfehlung für Cholin (DGE 2012). PC und SM sind eine wichtige Quelle für Cholin aus Lebensmitteln (Abratte *et al.* 2008, Detopoulou *et al.* 2008). Bei der Bedarfsdeckung von Cholin spielen außerdem die am Methioninstoffwechsel beteiligten

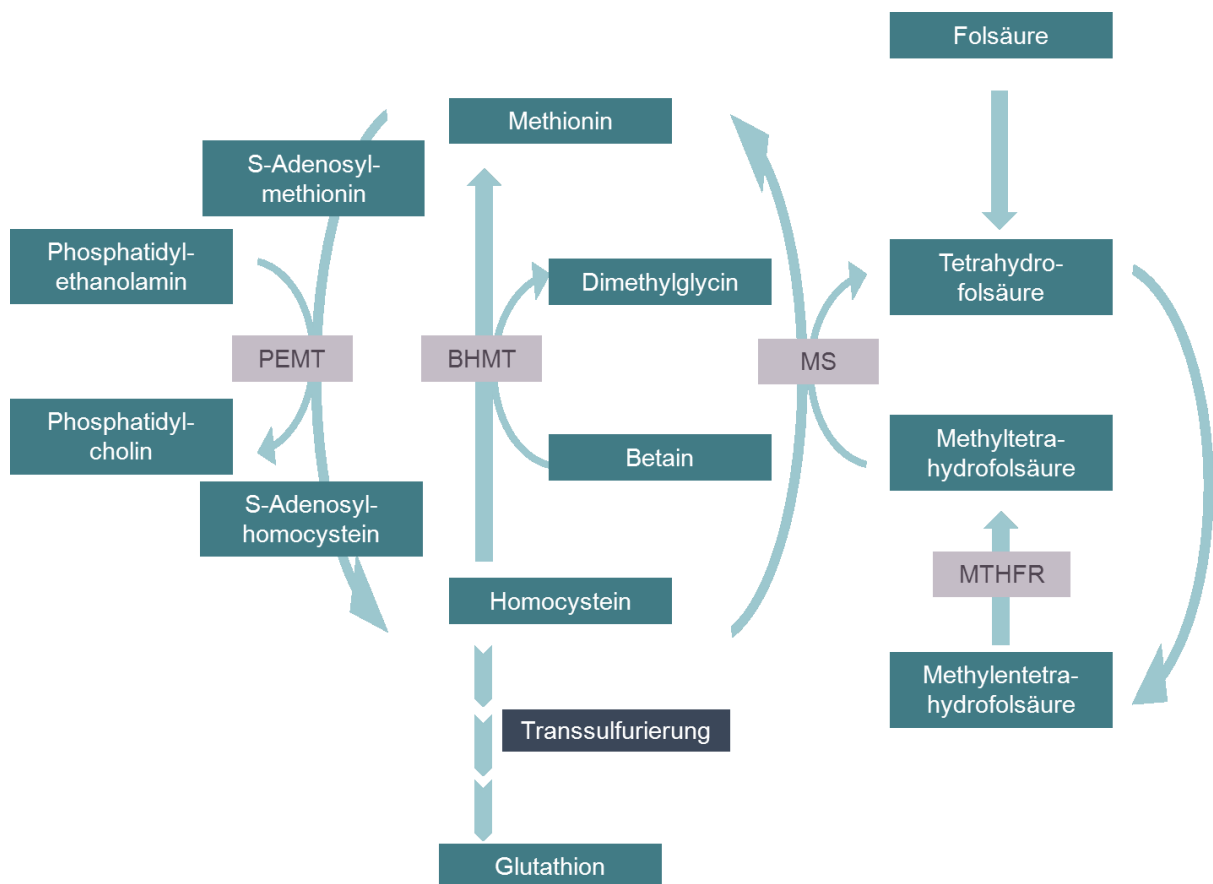
Nährstoffe eine Rolle. Dazu gehören Folat, Vitamin B12, und Betain. Schließlich müssen auch die im Folatzyklus beteiligten Vitamine Niacin, Riboflavin und B6 berücksichtigt werden (Hollenbeck 2010). Cholin bzw. Cholinmetabolite sind wichtig für den Aufbau und die Funktion von Zellmembranen, indem sie für die Synthese von PL genutzt werden. Außerdem ist Cholin Precursor von cholinergen Neurotransmittern wie Acetylcholin (Zeisel und Blusztajn 1994). Cholin ist weiterhin die größte Quelle für Methylgruppen aus Lebensmitteln (Niculescu und Zeisel 2002, Zeisel 2006). Wird der Cholinbedarf nicht gedeckt, stellen sich vor allem bei Männern und postmenopausalen Frauen Zeichen von Organdysfunktionen wie Fettleber und Muskelschädigungen ein (da Costa *et al.* 2006).

Für die Methylierung von Homocystein muss Cholin in der Leber oder Niere durch die mitochondriale Dehydrogenase zu Betinaldehyd umgewandelt werden, welches anschließend zu Betain oxidiert wird. Die Betain-Homocystein-Methyltransferase (BHMT) überträgt die Methylgruppe auf Homocystein. Alternativ können Methylgruppen durch die Methioninsynthase übertragen werden, dieser Weg ist abhängig von der 5-,10-Methylen-tetrahydrofolatreduktase (MTHFR), die 5,10-Methylen-Tetrahydrofolsäure zu 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure reduziert (Zeisel und Blusztajn 1994). Genetische Polymorphismen der MTHFR können die Konzentration von Homocystein im Serum beeinflussen (Mager *et al.* 2002, Ivanov *et al.* 2009). Ein funktionell relevanter Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) ist MTHFR C677T (rs1801133), der bei Homozygoten zu einem thermolabilen Enzym mit Funktionsverlust und zu einer Erhöhung der Plasma-Homocysteinkonzentration führt (Frosst *et al.* 1995). Dabei bewirkt der Genotyp MTHFR 677TT eher eine Hyperhomocysteinämie, wenn ein niedriger Folatstatus besteht (Holmes *et al.* 2011). Untersuchungen zeigten, dass etwa 8 % der Deutschen homozygote und 25 % heterozygote Träger dieses SNPs sind (Botto und Yang 2000). Für andere europäische Länder wurde eine ähnliche Verteilung ermittelt, dort liegt die homozygote Mutation zwischen 4 und 26 % und die heterozygote zwischen 32 und 51 % (Wilcken *et al.* 2003, Gueant-Rodriguez *et al.* 2006).

Epidemiologische Studien zeigen, dass eine höhere Zufuhr an Betain und Cholin mit niedrigeren Nüchtern-Homocysteinkonzentrationen assoziiert ist (Cho *et al.* 2006, Lee *et al.* 2010). In einer nichtkontrollierten zweiwöchigen Studie an Kindern mit Zystischer Fibrose wurde durch die Gabe von täglich 2 g Soja-Lecithin zwar Plasma-Methionin und SAM erhöht und der GSH-Status verbessert, der Homocysteinspiegel blieb jedoch unverändert (Innis *et al.* 2007). In einer doppelblinden, randomisierten und kontrollierten Cross-Over-Studie mit Männern, die zu Beginn der Studie eine mittlere Plasma-

Homocysteinkonzentration von etwa 15  $\mu\text{mol/l}$  hatten, wurde hingegen der Homocysteinspiegel durch die Gabe von täglich 34 g Soja-Lecithin (2,5 g Cholin pro Tag) über einen Zeitraum von zwei Wochen um 18 % gesenkt (Olthof *et al.* 2005). Bisher wurde noch nicht untersucht, inwieweit sich die Gabe von PC bei unterschiedlichen Genotypen der MTHFR C677T auf den Homocysteinspiegel auswirkt.

In einem Zellkulturversuch wurde beobachtet, dass die Gabe von DLPC und SAM, und noch stärker beide zusammen, die zelluläre GSH-Konzentration und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach einer Leptininkubation normalisiert (Cao *et al.* 2006).



**Abbildung 8: Methionin-Homocystein-Stoffwechsel in der Leber.**

Modifiziert nach Zhang *et al.* (2011a). Phosphatidylethanolamin-N-Transferase (PEMT) nutzt S-Adenosylmethionin (SAM) um S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) zu bilden, SAH wird dann zu Homocystein hydrolysiert. Homocystein wird zu Methionin remethyliert, entweder durch die Betain-Homocystein S-Methyltransferase (BHMT) oder durch die Methioninsynthase (MS) über den (MTHFR)-abhängigen Stoffwechsel. Aus Homocystein kann ebenso über den Stoffwechsel der Transsulfurierung Glutathion gebildet werden.

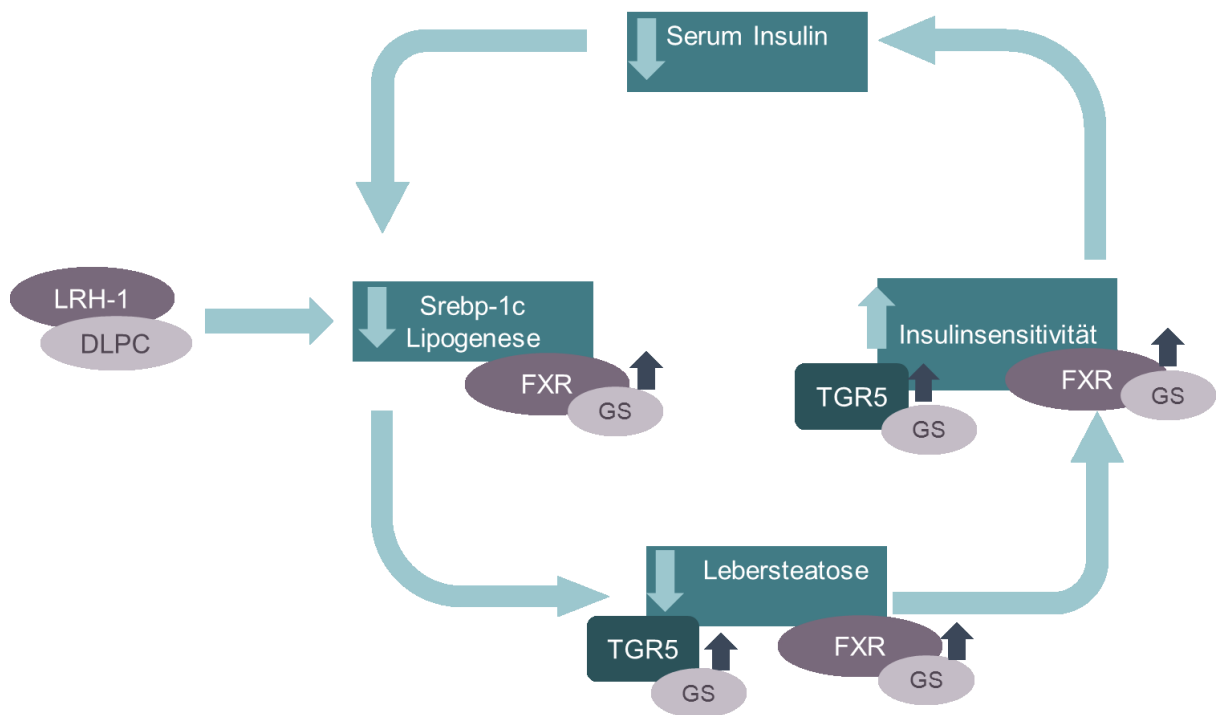
### 1.3.3 Wirkung von Phospholipiden auf Inflammationsparameter

Inflammation spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Atherosklerose (Libby 2002). Verschiedene Inflammationsparameter werden mit HKE assoziiert, diese sind u.a. C-reaktives Protein (CRP), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM) (Ridker *et al.* 2001, Basu *et al.* 2006). Möglicherweise können PL über die Bereitstellung von Cholin indirekt Inflammationsparameter beeinflussen. Eine epidemiologische Studie von Detopoulou (2008) zeigte, dass eine höhere Cholinzufuhr ab 250 bzw. 310 mg/d mit geringeren Konzentrationen des CRPs, IL-6 und dem TNF- $\alpha$  im Serum assoziiert ist. Für Soja-PL wurde bereits in Humanstudien und *in vitro* Untersuchungen gezeigt, dass es antiinflammatorisch bei Colitis ulcerosa wirken kann. (Treede *et al.* 2007, Stremmel *et al.* 2007, Schneider *et al.* 2010). Dabei schützen PL die Darmwand, indem sie zum einen in die Mucus-Schleimschicht und zum anderen in Membranen der Mukosazellen (Enterozyten) eingebaut werden. Für PC wurde eine Wirkung auf eine antiinflammatorische Signalkaskade gezeigt (Schneider *et al.* 2010). Ob diese Mechanismen auch bei gesunden Personen relevant sind und ob sie dort Inflammationsparameter beeinflussen, die an der Entstehung von Atherosklerose eine Rolle spielen, wurde noch nicht untersucht. Außerdem wirken ApoA1 und HDL antiinflammatorisch. HDL fördern den reversen Transport von Cholesterin von Makrophagen und Schaumzellen zurück zur Leber (Lewis und Rader 2005, Barter und Rye 2006). Die Wirkung der PL auf diese beiden Parameter wurde bereits in Abschnitt 1.3.1.2 beschrieben.

### 1.3.4 Wirkung von Phospholipiden auf Diabetes-Parameter

Diabetes mellitus Typ 2 ist ein Hauptrisikofaktor für HKE und liegt laut der Deutschen Diabetes Gesellschaft vor, wenn der HbA1c-Wert über 6,5 %, der Gelegenheits-Plasmaglukosewert über 200 mg/dl, der Nüchtern-Plasmaglukosewert über 126 mg/dl und der 2-h-Wert des oralen Glukosetoleranztests (OGTT) im venösen Plasma über 200 mg/dl (Kerner und Brückel 2011) liegen. Eine gestörte Glukosetoleranz oder gestörte Nüchternglukosekonzentration stellen Risikofaktoren für die zukünftige Entwicklung eines Diabetes und einer HKE dar, weshalb die Früherkennung und Behandlung von Diabetes eine wichtige Säule der HKE-Prävention ist (WHO 2007, WHO 2010a). Bisher gibt es erst wenige Untersuchungen über die Wirkung der PL auf Diabetes. Beim Menschen zeigten Snel *et al.* (2010) nach der Intervention eine signifikant niedrigere basale Glukosekonzentration als in der Placebogruppe, auf weitere

Stoffwechselfparameter hatte die Intervention allerdings keinen Einfluss. In einer Tierstudie von Shirouchi *et al.* (2008) führte eine vierwöchige Fütterung mit 2 % Soja-PI und 5 % Sojaöl im Vergleich zu 7 % Sojaöl zu einer nicht signifikanten Abnahme der Insulinspiegel in Zucker-Ratten (*fa/fa*). Eine Hyperinsulinämie wurde bei Kontrolltieren, nicht aber bei PI-gefütterten Tieren beobachtet. Zusätzlich war Adiponektin, ein Hormon das die Insulinwirkung verstärkt, in der Interventionsgruppe signifikant erhöht. In einer weiteren Studie mit Zucker-Ratten wurde durch eine 45-tägige Fütterung mit 0,5 % SM aus Hühnerhaut bzw. 0,5 % Glucosylceramid der Insulinspiegel um 21 bzw. 49 % gesenkt. Adiponektin wurde nur durch Glucosylceramid signifikant erhöht. (Yunoki *et al.* 2010). In insulinresistenten *db/db*-Mäusen bewirkte eine Fütterung (2 oder 3 Wochen) mit Dilauroyl-PC (C12:0/C12:0) (DLPC) im Vergleich zur Kontrolle niedrigere Glukose- und Insulinspiegel im Serum. In einem anschließenden Versuch wurde gezeigt, dass eine dreiwöchige Fütterung mit DLPC nur in adipösen *Lrh-1<sup>ff</sup>*-Mäusen, nicht jedoch in *Lrh-1<sup>-/-</sup>*-Knockout-Mäusen, die Glukose- und Insulinspiegel im Serum senkt und die Kenngröße der Insulinresistenz, „Homeostasis Model Assessment of Insulin-Resistenz“ (HOMA-IR), verbessert (Lee *et al.* 2011). *In vitro* konnte bestätigt werden, dass DLPC ein Leber-Rezeptor homolog-1 (LRH-1)-Agonist ist (Lee *et al.* 2011). LRH-1 ist ein nukleärer Orphan-Rezeptor, der eine entscheidende Rolle im reversen Cholesterintransport, der Gallensäurenhomöostase und der Steroidgenese spielt (Fayard *et al.* 2004). Daneben bewirkt eine Fütterung mit DLPC eine verminderte Expression des *sterol regulatory element binding protein-1c* (Srebp1-c) (Lee *et al.* 2011) und erklärt so mechanistisch die Verbesserung der Lebersteatose, die Erhöhung der Insulinsensitivität und die reduzierten Seruminsulinspiegel wie in Abbildung 9 dargestellt. Dipalmitoyl-PC hingegen aktivierte den LRH-1 Reporter nicht (Lee *et al.* 2011).



**Abbildung 9: Wirkung von Dilauroyl-Phosphatidylcholin (C12:0/C12:0) (DLPC) auf Insulin und Lebersteatose.**

Modifiziert nach Hohenester und Beuers (2011). DLPC induziert eine Leber-Rezeptor homolog-1 (LRH-1)-abhängige Verminderung der *sterol regulatory element binding protein-1c* (Srebp-1c)-Expression und führt zu einer Verbesserung der Lebersteatose, einer Erhöhung der Insulinsensitivität und reduzierten Seruminsulinspiegeln. Die verminderte Insulinkonzentration im Serum geht wiederum mit einer verminderten Srebp-1c-Expression einher. DLPC führt daneben zu einer erhöhten Bereitstellung von Gallensalzen (GS). Eine Aktivierung des nukleären GS-abhängige Rezeptor Farnesoid X Rezeptor (FXR) bewirkt die Senkung von Triglyceriden (Watanabe *et al.* 2004) und Glukose (Zhang *et al.* 2006) im Serum. Der Membranrezeptor (TGR5), ebenfalls GS-abhängig, erhöht die Glukosetoleranz (Thomas *et al.* 2009).

Die verminderte Insulinkonzentration im Serum geht wiederum mit einer verminderten Srebp-1c-Expression einher, sodass eine positive Rückkopplung entsteht. Zusätzlich führt DLPC zu einer erhöhten Bereitstellung von Gallensalzen (GS) (Lee *et al.* 2011), wodurch GS-abhängige Rezeptoren induziert werden. Dazu gehören der nukleäre Farnesoid X Rezeptor (FXR) und der Membranrezeptor TGR5. Eine Aktivierung von FXR bewirkt die Senkung von Triglyceriden (Watanabe *et al.* 2004) und Glukose im Serum (Zhang *et al.* 2006), die Aktivierung von TGR5 erhöht die Glukosetoleranz (Thomas *et al.* 2009). So könnten additive positive Effekte durch die Bereitsstellung von GS entstehen (Hohenester und Beuers 2011). Ein weiterer Mechanismus für die Verbesserung der Diabetesparameter könnte eine Hemmung der intestinalen Glukoseresorption sein, die in einer Arbeit von Barrenetxe *et al.* (2006) bereits gezeigt wurde.

Als hepatische Manifestation des Diabetes mellitus gilt die Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) (Hooper *et al.* 2011). PL können, neben dem Einfluss auf die direkten Diabetesparameter, einen Einfluss auf die Lebergesundheit haben, wie schon durch mehrere Arbeitsgruppen gezeigt wurde. Die Wirkung kann unter anderem durch die Bereitstellung von Cholin begründet werden, für das es bereits einen Health Claim der EFSA gibt (European Food Safety Authority 2011). Ein Cholinmangel kann für die Entwicklung von (Fett-) Lebererkrankungen verantwortlich sein (Buchman *et al.* 1995). Beim Menschen konnten Zeisel *et al.* (1991) zeigen, dass eine cholindefiziente Ernährung (13 mg/Tag) im Vergleich zu einer Diät mit hohem Cholingehalt (700 mg/Tag) zu signifikant höheren Alanin-Aminotransferase (ALT) -Aktivitäten, nicht aber zu veränderten Aspartat-Aminotransferase (AST) und  $\gamma$ -Glutamyltransferase (GGT) -Aktivitäten führt. Chronische Lebererkrankungen sind außerdem mit einer erniedrigten Aktivität der PEMT assoziiert. Diese erniedrigte Aktivität führt zu einem Mangel an PC in der Membran, und mindert weiter die Aktivität der PEMT und anderer Schlüsselenzyme, die beispielsweise mit der oxidativen Phosphorylierung im Zusammenhang stehen (Lieber *et al.* 2007). Für die Sekretion von VLDL wird PC benötigt, und bei Cholinmangel kann es zu einer intrazellulären Akkumulation von TG in der Leber kommen (Yao und Vance 1989). Die Gabe von PC, vor allem in Form von Polyen-PC und DLPC, kann den PC-Spiegel wieder erhöhen und diesen Teufelskreis durchbrechen (Lieber *et al.* 2007). Daneben kann 16:0/18:1-PC den *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR $\alpha$ ) aktivieren und so lipotrope und schützende Effekte haben (Lamaziere und Wolf 2010). In einer Studie an Mäusen zeigten Watanabe *et al.* (2011) eine Abnahme der Leber-TG durch eine Fütterung mit Milch-PL.



## 2 Zielsetzung

HKE sind die Todesursache Nummer eins weltweit, für die Lipidstoffwechselstörungen einen bedeutenden Risikofaktor darstellen. In der HKE-Prävention gelten die Senkung von Gesamt-C, LDL-C sowie die Erhöhung von HDL-C und des Verhältnisses von Gesamt-C/HDL-C als wichtige Behandlungsziele. Daneben stellen Inflammation und Diabetes mellitus wichtige HKE-Risikofaktoren dar.

Untersuchungen haben bereits für einige PL gezeigt, dass sie die C-Resorption hemmen und in den intermediären Lipidstoffwechsel eingreifen. Dabei hemmen PL mit einem hohen Anteil an SM und einem hohen Anteil an gesättigten FS die C-Resorption aus dem Darm stärker als PL, die kein SM enthalten und einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten FS haben. Zusätzlich üben gesättigte FS einen stärkeren Einfluss auf den intermediären Lipidstoffwechsel aus als mehrfach ungesättigte FS, indem sie einen stärkeren Anstieg an Apo A1 und HDL bewirken. Milch-PL haben einen hohen Anteil an SM (fast 20 %) und einen hohen Anteil an ungesättigten FS, wohingegen Soja-PL kein SM enthalten, dafür jedoch einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten FS aufweisen.

Ziel der Arbeit war es, folgende Fragen zu beantworten:

- 1 Haben Milch-PL beim Menschen eine Wirkung auf das Lipidprofil und weitere HKE-Risikoparameter und ist diese Wirkung unabhängig von den gebundenen Fettsäuren?
- 2 Haben Milch-PL aufgrund ihres hohen Gehalts an SM und der gesättigten Fettsäuren eine stärkere Wirkung auf das Lipidprofil und weitere HKE-Risikoparameter als Soja-PL?

Dazu wurden zwei humane Interventionsstudien mit jeweils etwa 60 übergewichtigen Männern zwischen 50 und 76 Jahren durchgeführt. In der Humanstudie 1 wurde die Wirkung der Gabe von 2 g Milch-PL pro Tag in 200 ml Milch mit Milch-TG mit ähnlichem FS-Muster verglichen. In der Humanstudie 2 wurde die Wirkung von 3 g Milch-PL im Vergleich zu 2,8 g Soja-PL untersucht, als Träger wurden 250 ml Milch eingesetzt. Zu Beginn und am Ende des Interventionszeitraums wurden medizinische Untersuchungen und Blutentnahmen durchgeführt. Im Serum wurden die Lipidstoffwechselfparameter HDL-C, LDL-C, Gesamt-C, Gesamt-C/HDL-C, Apo A1, Apo B, Lp(a) sowie PL gemessen. Als Begleitparameter wurden weitere Risikofaktoren für HKE untersucht, diese waren Glukose, Insulin und HOMA-IR, hsCRP, Complement C3, IL-6, sICAM, GSH und der Homocysteinspiegel. Daneben wurde als Sicherheitsparameter die Aktivität der



Leberenzyme GGT, ALT und AST bestimmt. Zusätzlich sollte in der Humanstudie 2 der Einfluss des Genotyps MTHFR C677T auf Interventionseffekte geprüft werden.

### 3 Experimenteller Teil

#### 3.1 Humanstudien

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Humanstudien, die am Max Rubner-Institut in Karlsruhe durchgeführt wurden. Beide Humanstudien wurden durch die Landesärztekammer Baden-Württemberg geprüft und befürwortet und nach den Empfehlungen des Weltärztebundes (Weltärztebund 2008) durchgeführt. Die Studien sind im deutschen Register Klinischer Studien registriert (Humanstudie 1: DRKS-ID: DRKS00000383; Humanstudie 2: DRKS-ID: DRKS00003125). Alle Probanden gaben vor Beginn der Studie ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme.

##### 3.1.1 Fallzahlbestimmung

Die Kalkulation des Stichprobenumfangs erfolgte mittels statistischer Power Abschätzung (Power 0,80; Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) unter Berücksichtigung der Probanden- und Methodenvariabilität. Bei einem erwarteten Effekt der Absenkung des Verhältnisses Gesamt-/HDL-Cholesterin um 10 % (vgl. Burgess *et al.* 2005) und einer Streuung der individuellen Effekte von 12 % waren 30 Personen pro Interventionsgruppe notwendig ( $\alpha$ -Fehler 5 %, zweiseitig und  $\beta$ -Fehler 10 %, einseitig).

##### 3.1.2 Studiendesign

Beide Studien wurden parallel, doppelblind, kontrolliert und randomisiert durchgeführt. Die Teilnehmer wurden über die Datenbank des Max Rubner-Instituts sowie Zeitungs- und Radioaufrufe rekrutiert. Die Probandenvorauswahl erfolgte über ein Fragebogen-gestütztes Telefoninterview. Zusätzlich fand im Anschluss eine medizinische Untersuchung statt, bei der Anamnesedaten der persönlichen und familiären Krankheitsgeschichte sowie anthropometrische Daten der Interessenten erfasst und Blutuntersuchungen durchgeführt wurden. In die Studien wurden Männer im Alter zwischen 50 und 76 Jahren eingeschlossen, die Nichtraucher waren und einen Body Mass Index (BMI) über  $27 \text{ kg/m}^2$  aufwiesen. Ausschlusskriterien waren die Einnahme von Medikamenten und Supplementen, die den Lipidstoffwechsel bzw. weitere zu bestimmende Parameter beeinflussen. Außerdem durften Alkoholiker, Diabetiker (Nüchternglukose  $\geq 120 \text{ mg/dl}$ ) und Allergiker gegen Milcheiweiß an den Studien nicht teilnehmen. Auch Personen mit Erkrankungen, welche die Nährstoffresorption,

Verdauungsfunktion, Verstoffwechselung oder Ausscheidung betreffen oder bei denen eine Operation des Intestinaltrakts, oder Kortikosteroidbehandlung in den vergangenen drei Monaten vorlag, wurden ausgeschlossen. Weiterhin durften Personen, bei denen eine geringe *Compliance* zu erwarten war, nicht eingeschlossen werden. Bei der zweiten Humanstudie war außerdem eine Sojaallergie oder -unverträglichkeit ein Ausschlusskriterium.

Während der Studien galten als *Drop-out*-Kriterien die Einnahme von Medikamenten, die zu bestimmende Parameter beeinflussen können, das Auftreten von unvertretbaren und unerwünschten Ereignissen und das Auftreten von akuten Magen-Darm-Erkrankungen im Versuchszeitraum. Probanden, die die Versuchsbedingungen nicht eingehalten hätten und Probanden, die die Zustimmung zur Teilnahme an der Studie widerrufen hätten, wären ausgeschlossen worden. Bei der Auswertung der Studie durften die Daten von Probanden, bei denen unvertretbare, unerwünschte Ereignisse auftraten, die die Versuchsbedingungen nicht einhielten oder bei denen relevante Daten fehlten, nicht verwendet werden.

### 3.1.3 Blutentnahme und Probengewinnung

Zu Beginn und am Ende der Studien wurde den Probanden Blut aus der *Vena mediana cubiti* entnommen. Dazu kamen diese nüchtern zwischen 07.00 und 10.00 Uhr in das Studienzentrum des Max Rubner-Instituts. Am Vortag sollten die Probanden auf Alkoholkonsum, Sport und Sauna verzichten und abends nur eine leichte Mahlzeit verzehren. Ab 20.00 Uhr des Vorabends durften die Teilnehmer nichts mehr essen und nur noch Wasser trinken. Ethylendiamintetraessigsäure- (EDTA-) Plasma wurde durch EDTA-Monovetten (Sarstedt-Monovette, Nümbrecht) nach Zentrifugation bei 2500 g für 10 min bei 4 °C gewonnen, Serum wurde in Serum-Monovetten (Sarstedt) nach der Blutgerinnung (30 min) durch Zentrifugation bei 2500 g für 10 min bei Raumtemperatur abgetrennt. Alle Proben wurden nach dem Aliquotieren bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

### 3.1.4 Anthropometrische und physische Messungen

Zu Beginn und am Ende des Studienzeitraums wurden bei den Teilnehmern anthropometrische und physische Messungen vorgenommen. Die Körpergröße und das Körpergewicht wurden mit einer Messstation (Seca, Hamburg) erfasst, der BMI wurde berechnet, indem das Körpergewicht (in kg) durch die Körpergröße (in m<sup>2</sup>) dividiert

wurde. Der Bauchumfang wurde mit einem Maßband von Seca gemessen. Die Bioelektrische Impedanzanalyse (SensorMedics, Aschaffenburg) wurde genutzt, um das Körperfett in Prozent zu ermitteln. Der systolische und diastolische Blutdruck sowie der Puls wurden mit einem Messgerät von Nellcor Puritan Bennett (Boulder, Colorado, USA) gemessen und der Mittelwert aus der zweiten und dritten Messung, Messabstand jeweils 5 Minuten, berechnet. Alle Messungen wurden nach den Richtlinien der WHO 2008 durchgeführt. Weiterhin wurden im Urin Proteine, Glukose, Erythrozyten, Leukozyten, Bilirubin und der pH-Wert gemessen (combiscreen® control, Analyticon® Biotechnologies AG, Lichtenfels und Lesegerät).

### 3.1.5 Erfassung der Energie- und Nährstoffzufuhr

Die Energie-, Alkohol- und Nährstoffzufuhr, und der Verzehr von Milch- und Milchlischgetränken, Milcherzeugnissen sowie Käse und Quark wurden mit Hilfe von Ernährungsprotokollen erfasst. Dazu haben die Probanden 4-Tage-Schätzprotokolle während und außerhalb der Studien geführt. Die Ernährungsprotokolle basierten auf der Vorlage des Deutschen Institut für Ernährungsforschung (Koebnick *et al.* 2003) in Anlehnung an Hoffmann *et al.* (1994). Diese wurden für die Studien überarbeitet, indem regionale und saisonale Lebensmittel mit aufgenommen wurden und Mengenangaben angepasst wurden. Die Auswertung der Nährstoffe, Vitamine und Mineralstoffe erfolgte mit der Ernährungssoftware Prodi® Version 5.7, die auf dem Bundeslebensmittelschlüssel (BLS), Version II.3 (Humanstudie 1) basiert bzw. Prodi® Version 5.9, die auf dem Bundeslebensmittelschlüssel Version 3.0 (Humanstudie 2) basiert.

Die Berechnung der täglichen Cholinzufuhr der Probanden erfolgte auf Grundlage der USDA-Datenbank (Howe *et al.* 2004), die den Cholingehalt von Lebensmitteln beinhaltet. Der Verzehr von Lebensmitteln aus den Lebensmittelgruppen Fleisch, Wurstwaren und Fleischerzeugnisse, Eier, Brot und Getreideerzeugnisse, Milch, Milcherzeugnisse und Käse, Süßwaren, Fette; Kartoffeln, Obst und Obsterzeugnisse, Nüsse und Samen, Gemüse, Pilze, Hülsenfrüchte wurde ermittelt und mit dem mittleren Cholingehalt dieser Lebensmittel multipliziert. Die tägliche Zufuhr an PL wurde berechnet, indem durchschnittliche PL-Gehalte von Lebensmitteln (Fleisch, Wurstwaren und Fleischerzeugnisse, Eier, Brot und Getreideerzeugnisse, Milch, Milcherzeugnisse und Käse, Süßwaren, Fette; veröffentlicht in Cohn *et al.* (2010a), Weihrauch und Son (1983) und Rombaut *et al.* (2005)) mit der täglichen Zufuhr dieser Lebensmittel multipliziert

wurden. Sofern für Lebensmittel keine PL-Gehalte vorlagen, wurde der PL-Gehalt über den Cholingehalt dieser Lebensmittel abgeschätzt (Zeisel *et al.* 2003).

Durch die Ernährungsprotokolle sollte erfasst werden, ob sich der Lebensmittelverzehr und die Nährstoffzufuhr zwischen den Gruppen unterscheiden, und ob die Studie diese beeinflusst. Weiterhin dienten die Ernährungsprotokolle als Kontrolle, ob mögliche beobachtete Effekte auf den Lebensmittelverzehr zurückzuführen sind. Ein Vergleich mit den Daten aus der Nationalen Verzehrsstudie II (NVS II), Referenzgruppe sind Männer von 51 bis 64 Jahren, sollte die Plausibilität der Angaben der Probanden prüfen und zeigen, ob die Probanden einen üblichen Lebensmittelverzehr aufweisen.

### 3.1.6 Restriktionen während der Studie

Während des gesamten Studienzeitraums sollten die Probanden ihre gewohnte Ernährungsweise beibehalten und ihren üblichen Tätigkeiten nachgehen.

Allerdings gab es einige Einschränkungen. Die Probanden durften nicht mehr als ein Glas Alkohol und ein Glas Kuhmilch am Tag trinken und keine Produkte verzehren, die mit Phytosterinen, Folsäure oder Omega-3-Fettsäuren angereichert wurden. ACE-Getränke waren ebenfalls nicht erlaubt. Eine Liste mit den zu vermeidenden Lebensmitteln wurde den Probanden ausgehändigt. Weiterhin durften die Teilnehmer kein Blut spenden. Diese Einschränkungen sollten eine Woche vor Studienbeginn bis zum Ende der Studie eingehalten werden.

### 3.1.7 Humanstudie 1: Milch-Phospholipide versus Milch-Triglyceride

In dieser ersten Humanstudie wurde die Wirkung von Milch-PL im Vergleich zu Milch-TG mit ähnlichem Fettsäurenmuster untersucht. An der Humanstudie 1 nahmen 63 Männer zwischen 50 und 75 Jahren teil, wovon ein Proband während der Studie ausgeschlossen wurde, weil er ein nicht erlaubtes Medikament einnahm. In Tabelle 3 sind die Basisdaten der Probanden zu Beginn der Studie aufgelistet ( $n = 62$ ). Die beiden Interventionsgruppen unterschieden sich in den untersuchten Parametern zu Beginn der Studie nicht voneinander. Die Probanden waren übergewichtig ( $n = 27$ ) bis adipös ( $n = 35$ ), hatten einen erhöhten Bauchumfang ( $110 \pm 7,2$  cm; MW  $\pm$  SD) sowie erhöhte Gesamt-C-Konzentrationen ( $227 \pm 34$  mg/dl; MW  $\pm$  SD). In Abbildung 10 ist das Fließschema der Humanstudie 1 dargestellt.

**Tabelle 3: Basisdaten der Probanden zu Beginn der Humanstudie 1 (n = 62).**

	Kontrolle (n = 31)	Milch-PL (n = 31)
Alter (Jahre)	61,7 ± 6,5	63,2 ± 6,3
Größe (m)	1,75 ± 0,05	1,75 ± 0,07
Gewicht (kg)	94,7 ± 12,6	94,2 ± 7,4
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30,9 ± 2,9	30,7 ± 1,9
Bauchumfang (cm)	109 ± 8,1	110 ± 6,1
Körperfettmasse (%)	30,8 ± 2,4	31,2 ± 2,6
Gesamt-C (mg/dl)	220,0 ± 36,2	233,0 ± 31,8
HDL-C (mg/dl)	50,8 ± 13,1	55,2 ± 12,9
LDL-C (mg/dl)	138,3 ± 29,4	144,8 ± 31,8
Gesamt-C/HDL-C	4,50 ± 1,05	4,46 ± 1,23
Triglyceride (mg/dl)	124,8 ± 43,7	129,3 ± 70,8

Die Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (ungepaarter t-Test, statistische Signifikanz bei  $p \leq 0,05$ ).

#### 3.1.7.1 Durchführung der Humanstudie 1

Die Interventionsstudie erstreckte sich über einen Zeitraum von acht Wochen, in dem die Probanden täglich je nach randomisierter Gruppenzuteilung entweder das Milch-PL- (Gruppe A) oder das Kontrollgetränk (Gruppe B) verzehrten. Das Getränk sollte mit ein bis zwei fetthaltigen Mahlzeiten eingenommen werden. Die benötigten Getränke wurden 4 Mal im Abstand von zwei Wochen für den achtwöchigen Interventionszeitraum an die Probanden ausgegeben, wobei die erste Ausgabe unmittelbar nach der zweiten Blutentnahme erfolgte, und die zweite Ausgabe in der vierten Studienwoche folgte.

Gruppe A: 200 ml Milch, angereichert mit 2 g Milch-PL

Gruppe B: 200 ml Milch, angereichert mit 2 g TG

Während der Studie und eine Woche nach Beendigung der Studie führten die Probanden Ernährungsprotokolle.

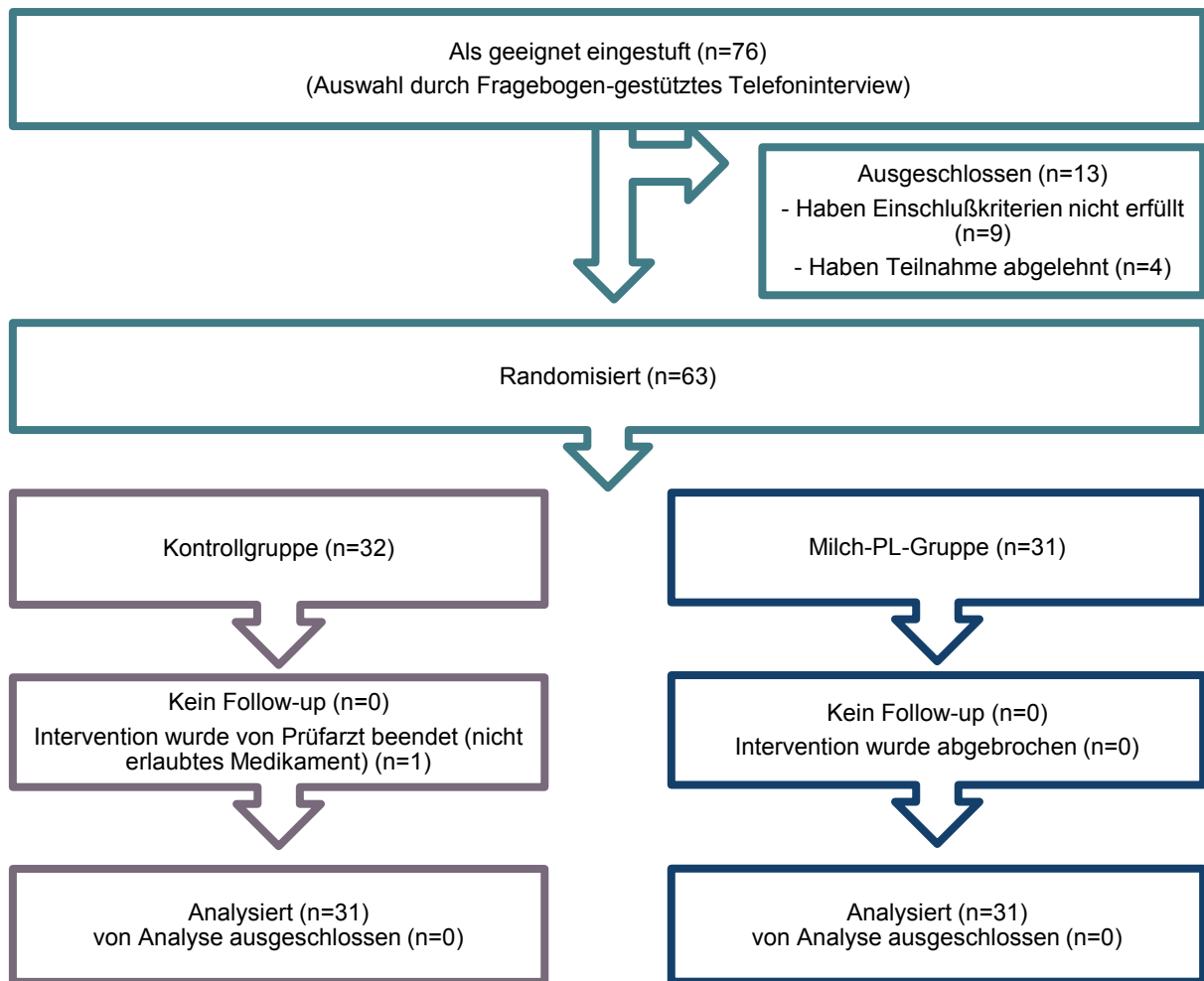


Abbildung 10: Fließschema der Humanstudie 1.

### 3.1.7.2 Studienmilchen der Humanstudie 1

Bei den Studienmilchen handelt es sich um Milch, angereichert mit Milch-PL bzw. Milchfetten als Kontrolle, die durch die Unternehmensgruppe Theo Müller GmbH & Co. KG, Fischach-Aretsried hergestellt wurden. Das Milch-PL-Pulver wurde von der Firma Uelzena, Uelzen hergestellt und wird von der Firma Lecico GmbH, Hamburg unter dem Namen Lipamin M 20 vertrieben. Von dem Pulver liegen chemische, physikalische sowie mikrobiologische Analysedaten vor (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4: Analysedaten des Milch-Phospholipidpulvers in Humanstudie 1.**

Zusammensetzung	Lipamin M 20 (Gewichtsprozent)
Wasser	2,1
Asche	5,8
Eiweiß	51,6
Kohlenhydrate	5,4
Fett	31,6
Phospholipide gesamt	18,4
Phosphatidylcholin	5,2
Phosphatidylinositol	1,5
Phosphatidylserin	2,1
Sphingomyelin	4,3
Phosphatidylethanolamin	4,8
Andere Phospholipide	0,5

Lipamin M 20, Charge 0000258288, Angaben des Herstellers.

Für die PL-Milch wurden pro 200 ml Milch (1,5 % Fettgehalt) 10,8 g Lipamin M 20 Pulver eingearbeitet, anschließend erfolgte die Abpackung und Portionierung in 200 ml Flaschen. Eine Tagesportion von 200 ml Milch enthielt 2 g Milch-PL. Als Kontrollgetränk wurde eine Milch hergestellt, die der PL-Milch im Kalorien- und Fettgehalt gleich sein sollte (s. Tabelle 5). Dazu wurde Milch (1,5 % Fettgehalt) mit Magermilchkonzentrat und Milchrahm so gemischt, dass in einer Tagesportion von 200 ml Milch zusätzliche 2 g Milch-TG enthalten waren. Aufgrund dieser Rezeptur unterschieden sich die Milchen etwas im Protein- und Laktosegehalt. Weiterhin war die Proteinqualität verschieden, da das PL-Präparat überwiegend Proteine der MFGM enthält, die nur 1-2 % der Proteine in der Vollmilch ausmachen (Dewettinck *et al.* 2008). Das FS-Muster der Milch-TG wurde



nicht analysiert, man darf aber davon ausgehen, dass dies zu rund 80 % mit dem der Milch-PL übereinstimmt (Sánchez-Juanes *et al.* 2009). Unter Verwendung von Lebensmitteln kann keine Kontrollmilch hergestellt werden, die in der Nährstoff- und FS-Zusammensetzung zu 100 % identisch mit der PL-Milch ist.

**Tabelle 5: Zusammensetzung der Studienmilchen in Humanstudie 1.**

Zusammensetzung	Kontrollmilch	PL-Milch
Basis	Milch (1,5 % Fettgehalt)	Milch (1,5 % Fettgehalt)
angereichert mit	Rahm und Magermilchpulver	Lipamin M20 (5,4 %)
Fett (%)	3,4 ± 0,1	3,2 ± 0,2
davon Phospholipide (%) *	0	1
Protein (%)	4,3 ± 0,1	5,7 ± 0,2
Laktose (%)	6,2 ± 0,1	4,8 ± 0,1
Energie (kcal/100 g) *	74,5	72,3
Trockenmasse (%)	14,6 ± 0,2	15,0 ± 0,4

Mittelwerte aus Analysen der vier Chargen. Für jede Charge wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt. \* Gehalt wurde kalkuliert.

### 3.1.8 Humanstudie 2: Milch-Phospholipide versus Soja-Phospholipide

In dieser zweiten Humanstudie sollte die Wirkung von Milch-PL im Vergleich zu Soja-PL untersucht werden. An der Humanstudie 2 nahmen 58 Männer zwischen 50 und 76 Jahren teil. Ein Proband aus der Milch-PL-Gruppe musste die Studie aufgrund unerwarteter Nebenwirkungen abbrechen. In Abbildung 11 ist das Fließschema der zweiten Humanstudie dargestellt und in Tabelle 6 sind die Basisdaten der Probanden zu Beginn der Studie aufgelistet. Auch in dieser Studie unterschieden sich die beiden Interventionsgruppen in den untersuchten Parametern zu Beginn der Studie nicht voneinander. Das Probandenkollektiv wies sich durch übergewichtige ( $n = 32$ ) und adipöse ( $n = 25$ ) Teilnehmer mit erhöhten Gesamt-C-Konzentrationen ( $216 \pm 34$  mg/dl; MW  $\pm$  SD) und einem erhöhten Bauchumfang ( $108,2 \pm 6,4$  cm; MW  $\pm$  SD) aus.

### 3.1.8.1 Durchführung der Humanstudie 2

Das Studiendesign wurde leicht modifiziert, indem der Studienzeitraum auf sieben Wochen verkürzt wurde. Vor und während der Studie führten die Teilnehmer Ernährungsprotokolle. Die Studienmilch wurde zu Beginn der Studie für den gesamten Studienzeitraum ausgegeben.

Gruppe A: 250 ml Milch, angereichert mit 2,8 g Soja-PL

Gruppe B: 250 ml Milch, angereichert mit 3 g Milch-PL

**Tabelle 6: Basisdaten der Probanden zu Beginn der Humanstudie 2.**

	Soja-PL (n = 29)	Milch-PL (n = 28)
Alter (Jahre)	63,3 ± 6,1	62,9 ± 6,9
Größe (m)	1,74 ± 0,06	1,77 ± 0,08
Gewicht (kg)	91,0 ± 8,6	95,6 ± 10,4
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30,2 ± 2,6	30,6 ± 2,3
Bauchumfang (cm)	107,3 ± 6,6	109,1 ± 6,2
Körperfettmasse (%)	30,9 ± 2,5	31,2 ± 3,3
Gesamt-C (mg/dl)	210,8 ± 32,3	221,6 ± 35,4
HDL-C (mg/dl)	50,6 ± 12,2	50,9 ± 10,8
LDL-C (mg/dl)	138,1 ± 26,5	148,1 ± 29,2
Gesamt-C/HDL-C	4,36 ± 1,04	4,46 ± 0,78
Triglyceride (mg/dl)	130,3 ± 59,5	132,8 ± 50,8

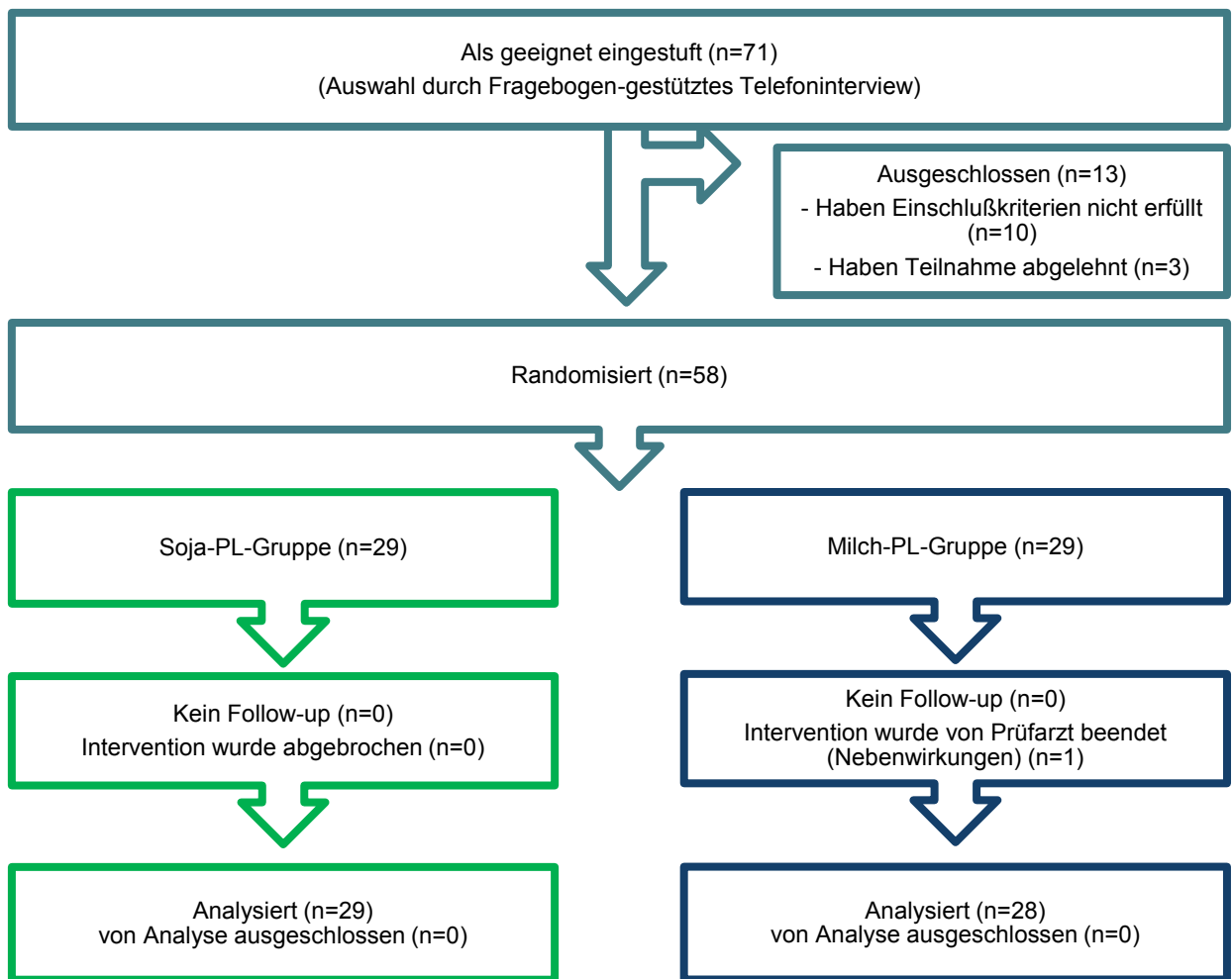


Abbildung 11: Fließschema der Humanstudie 2.

### 3.1.8.2 Studienmilchen der Humanstudie 2

Die Studienmilchen enthielten PL aus Milch bzw. aus Soja. Die PL-Pulver Lipamin M 20 (Milch-PL) bzw. Lecico P 900 IPM (Soja-PL) wurden von der Firma Lecico GmbH, Hamburg, bereitgestellt. Von den Pulvern liegen chemische, physikalische sowie mikrobiologische Prüfungen vor (siehe Tabelle 7, Tabelle 8, Tabelle 9). Die Einarbeitung der PL-Pulver erfolgte durch die Milchwerke "Mittelbe" GmbH, Stendal. Pro 250 ml Milch (1,5 % Fettgehalt) wurden 9,6 g Lipamin M 20 Pulver bzw. 4,2 g Lecico P 900 IPM eingearbeitet, anschließend erfolgte dort die Abpackung und Portionierung. Eine Tagesportion von 250 ml Milch enthielt 3 g Milch- bzw. 2,8 g Soja-PL. Der Fett-, Protein-, Kohlenhydrat- und Mineralstoffanteil beider Getränke war äquivalent. Die Milchen wurden als „haltbare“ Milchen in einer Charge produziert und entsprachen den Gesetzen und Verordnungen des Lebensmittelrechts.

**Tabelle 7: Analysedaten der Phospholipidpulver in Humanstudie 2.**

Zusammensetzung	Lecico P 900 IPM (Gewichtsprozent)	Lipamin M 20 (Gewichtsprozent)
Wasser	1,5	3,3
Asche	8,5	n.b.
Eiweiß	n.b.	41
Kohlenhydrate	1	1
Fett	91	41
Phospholipide gesamt	66,1	31,2
Phosphatidylcholin	23,0	9,2
Phosphatidylinositol	16,6	2,5
Phosphatidylserin	0,6	2,9
Sphingomyelin	n.d.	7,9
Phosphatidylethanolamin	16,8	7,8
Andere Phospholipide	9,2	1,1

Lecico P 900 IPM (Charge 30-1-10-032) und Lipamin M 20 (Charge 110215/1). n.b. = nicht bestimmt. n.d. = nicht detektiert.

**Tabelle 8: Fettsäurenmuster der Phospholipide der Phospholipidpulver in Humanstudie 2.**

Fettsäurenmuster	Lecico P 900 IPM (%)	Lipamin M 20 (%)
Gesättigte Fettsäuren	23,5	68,7
Einfach ungesättigte Fettsäuren	9,8	26,3
Mehrfach ungesättigte Fettsäuren	64,7	2,0
Transfettsäuren	2,0	3,1

Die Analysenergebnisse der Pulver Lipamin M 20 (Charge 0000258288) und Lecico P 900 IPM (30-1-10-032) wurden von Lecico zur Verfügung gestellt. Das Fettsäurenmuster des PL-Pulvers Lipamin M 20, Charge 110215/1, ist nicht bestimmt worden. Da aber, wie im Jahr 2010, die PL aus Buttermilch isoliert wurden, dürfte das Fettsäuremuster dem der Charge 0000258288 sehr nahe kommen.

**Tabelle 9: Zusammensetzung der Studienmilchen in Humanstudie 2.**

Zusammensetzung	Soja-PL	Milch-PL
Basis	Milch (1,5 % Fettgehalt)	Milch (1,5 % Fettgehalt)
angereichert mit	Lecico P 900 IPM (1,67 %)	Lipamin M20 (3,85 %)
Fett	2,5	2,6
davon Phospholipide*	1,1	1,2
Protein	3,4	5,0
Laktose	4,4	4,5
Trockenmasse	11,7	13,7

Analysenergebnisse wurden von den Milchwerken „Mittellelbe“ zur Verfügung gestellt.

\* Phospholipidgehalt wurden kalkuliert.

## 3.2 Analytische Methoden

### 3.2.1 Klinische Routineparameter

Die klinischen Routineparameter GGT, AST, Bilirubin, Glukose, Harnsäure, Kreatinin und Glomeruläre Filtrationsrate, die Serumlipide Gesamt-C, HDL-C, LDL-C, TG und ein kleines Blutbild wurden durch das MVZ Labor Prof. Seelig (Karlsruhe) analysiert.

Am Max Rubner-Institut wurden die Parameter Apo A1, Apo B, Complement C3 (nur in Humanstudie 1) und Lp(a) turbidimetrisch und ALT enzymatisch mit dem klinischen

Automaten Konelab 20i und Testsystemen der Firma Thermo Scientific, Passau bestimmt. Mittels *enzyme linked immunoassay* (ELISA) wurden die Serumkonzentrationen von Insulin und hsCRP (DRG Instruments, Marburg und IBL, Hamburg) sowie sICAM und IL-6 (R&D Systems, Abdingdon, United Kingdom) ermittelt. Die Serumphospholipide wurden photometrisch durch den enzymatischen Assay von WAKO Chemicals GmbH (Neuss) quantifiziert. Die Messung erfolgte an den Geräten „Thermomax microplate reader“ mit der Software „SOFTmax® for Windows™“ Version 2.31 (Molecular Devices GmbH) bzw. mit „Tecan Safire<sup>2</sup>“ mit der Software „Detection Suite“ Version 1.60.

Zur Einschätzung der Insulinresistenz wurde die Formel von (Matthews *et al.* 1985) HOMA-IR eingesetzt:

$$\text{HOMA-IR} = c [\text{Insulin in } \mu\text{U/ml}] \times c [\text{Glukose in mg/dl}] / 405$$

### 3.2.2 Bestimmung von Homocystein

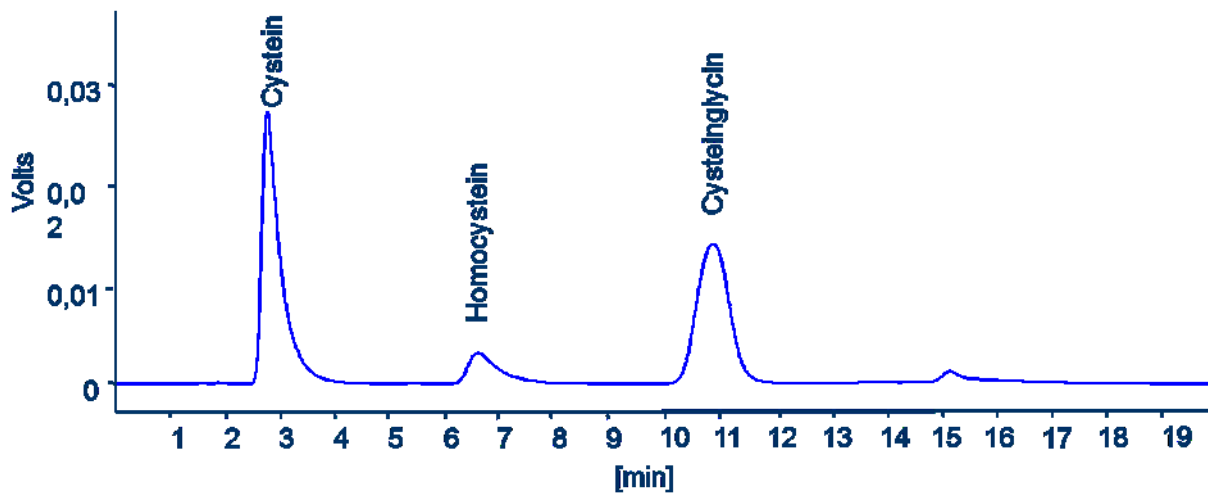
Für die Hochleistungsflüssig-Chromatographie (HPLC)/Fluoreszenz wurde Plasma-Homocystein mit Ammonium-7-fluorbenzol-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonat (SBD-F) derivatisiert (Kusmieriek *et al.* 2011). Für die Probenaufbereitung wurden 50 µl EDTA-Plasma mit 50 µl Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup>) und 10 µl Tris-(2-carboxylethyl)-phosphin (100 g/l) versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß wurden 90 µl Trichloressigsäure (100 g/l mit 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)) dazu gegeben, gevortext und für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Für die weiteren Pipettierschritte wurde in einem neuen Eppendorf-Gefäß 125 µl Boratpuffer (0,125 M, 4 mM EDTA, pH 9,5), 10 µl NaOH (1,55 M) und 50 µl SBD-F (1 g/l) vorgelegt und 50 µl des klaren Probenüberstandes dazu pipettiert. Nach einer Inkubation von 60 min bei 60 °C im Dunkeln wurde die aufgearbeitete Probe kurz zentrifugiert und 50 µl des Überstands in ein HPLC-Probengefäß gegeben. Die HPLC-Analyse erfolgte an einem Hochdruckgradientensystem der Firma Shimadzu, welches aus einem Controller (SCL-10Avp), zwei Pumpen (LC-Atvp), einem Autosampler (SIL-10Advp) sowie einem Fluoreszenz-Detektor (RF-10A XL) bestand. Die Daten wurden mit der Software Shimadzu Class Vp 6.12 ausgewertet. Als stationäre Phase wurde die C-18-Trennsäule LiChrosorb (5 µm RP-18, 125 x 4 mm i.D. Phenomenex, Aschaffenburg) verwendet, der eine C-18 Vorsäule (4 x 3,0 mm i.D., Phenomenex) vorgeschaltet war. 20 µl der Proben wurden automatisch bei Raumtemperatur injiziert. Wasser mit 0,1 % Ameisensäure

(HCOOH) (A) und Acetonitril (B) wurden als Eluenten verwendet. Das Gradientenprogramm ist in Tabelle 10 aufgelistet. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit einer Extinktion bei 385 nm und einer Emission bei 515 nm (Toyo'oka und Imai 1983). Mit einer externen Homocysteinkalibrierung (Konzentrationen von 0,5 bis 100 µM, gelöst in Wasser) wurde quantifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode validiert. Die Intraassay-Impräzision wurde mit einer Pool-Plasmaprobe bestimmt, die 11 Mal parallel aufgearbeitet und anschließend injiziert wurde. Die Interassay-Impräzision wurde ermittelt, indem Kontrollplasma (Level 2, ClinChek®, RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, München) an drei unterschiedlichen Tagen jeweils aufgearbeitet und injiziert wurde. Die Unrichtigkeit wurde mit Kontrollplasmen mit unterschiedlichen Homocysteinkonzentrationen (Level 1 = 9,63 µmol/l, Level 2 = 27,1 µmol/l) (ClinChek®, RECIPE Chemicals + Instruments GmbH) bestimmt. Die Validierung und Überprüfung der Methode ergab für die Intraassay-Impräzision 2,9 % und für die Interassay-Impräzision 5 %. Die Unrichtigkeit lag für Level 1 bei 8,2 % und für Level 2 bei 4,9 %. Die Ergebnisse zeigen, dass die Methode präzise und richtig die Homocysteinkonzentration bestimmt und damit valide Daten erhoben werden können. In Abbildung 12 ist ein repräsentatives HPLC/Fluoreszenz-Chromatogramm einer aufgearbeiteten humanen Plasmaprobe dargestellt.

**Tabelle 10: Gradientenprogramm der HPLC/Fluoreszenz für die Homocysteinbestimmung.**

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)	Flussrate (ml/min)
0	100	0	1
5	100	0	1
15	95	5	1
16	100	0	1
20	100	0	1

Eluent A = Wasser (0,1 % HCOOH), Eluent B = Acetonitril.

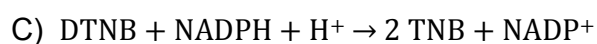
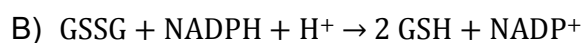


**Abbildung 12: Repräsentatives HPLC/Fluoreszenz-Chromatogramm von Homocystein einer humanen Plasmaprobe.**

Homocystein und die weiteren im Chromatogramm erkennbaren Peaks der SH-haltigen Aminosäuren Cystein und Cysteinglycin sind gekennzeichnet.

### 3.2.3 Bestimmung von Glutathion und Glutathiondisulfid

In dem Assay (Griffith 1985) wird das Gesamtglutathion ( $=[\text{GSH}] + \frac{1}{2} \times [\text{GSSG}]$ ) in den Erythrozyten bestimmt. Dabei reagiert GSH nichtenzymatisch mit 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoat) (DTNB) zu GSSG und 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB) (Reaktion A). Anschließend wird GSSG durch die Glutathionreduktase (GR) und reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) zu GSH reduziert (Reaktion B), welches wiederum nach Reaktion A reagiert. Die Konzentrationen von DTNB, NADPH und GR sind so gewählt, dass die Rate der Umsetzung (Reaktion C) bei konstanter Temperatur linear-proportional zu der Konzentration von Gesamtglutathion ist. Die Quantifizierung erfolgt mit einer GSH-Kalibrierung (Konzentrationen von 0,5 bis 5  $\mu\text{M}$  im Assay).



Für die GSH-Bestimmung wurde 200  $\mu\text{l}$  frisches EDTA-Vollblut direkt nach der Blutentnahme mit 600  $\mu\text{l}$  5%iger Sulfosalicylsäure (SSA) versetzt. Dies bewirkte eine



Zelllyse und Proteinpräzipitation. Nach Vortexen wurde das Gemisch abzentrifugiert (10 min, 10 000 g), und der klare Überstand abgenommen.

Für die Probenanalyse wurden in Halbmikroküvetten 885 µl Puffer (0,3 mM NADPH, 143 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 mM EDTA, pH 7,5, täglich frisch angesetzt), 10 µl 5 %ige SSA und 10 µl des Probenüberstands (siehe oben) vorgelegt und gemischt. Nach Zugabe des DTNB-Puffers (6 mM DTNB, 143 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 mM EDTA, pH 7,5) wurde die Küvette für 10 min inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch 10 µl GR-Enzymlösung (100 U/ml GR, 143 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 mM EDTA, pH 7,5) gestartet. Die Bildung des TNB-Anions wurde in Abhängigkeit von der Zeit (30'') bei einer Wellenlänge von 412 nm und 25 °C gemessen ( $\epsilon_{\text{TNB}^-}$  bei 412 nm = 13,6 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>). Die Messungen wurden an einem Perkin Elmer UV/VIS Spektrometer „Lambda Bio 20“ durchgeführt und mit der Software UV WinLab Version 1.1 ausgewertet.

Berechnung der Gesamtglutathionkonzentration im Vollblut:

$$[GSH \text{ in } \mu M]_{\text{Vollblut}} = \frac{y - b}{a} \times D_1 \times D_2$$

a = Steigung Kalibrierkurve

b = Schnittpunkt Kalibrierkurve

y = ΔA/min

D<sub>1</sub>: Verdünnungsfaktor für Verdünnung des Blutes mit Sulfosalicylsäure = 4

D<sub>2</sub>: Verdünnungsfaktor für Verdünnung der Probe in der Küvette = 100

Die Glutathionkonzentration in den Erythrozyten wurde auf Basis der Gesamtglutathionkonzentration im Vollblut und des Hämatokritwertes berechnet:

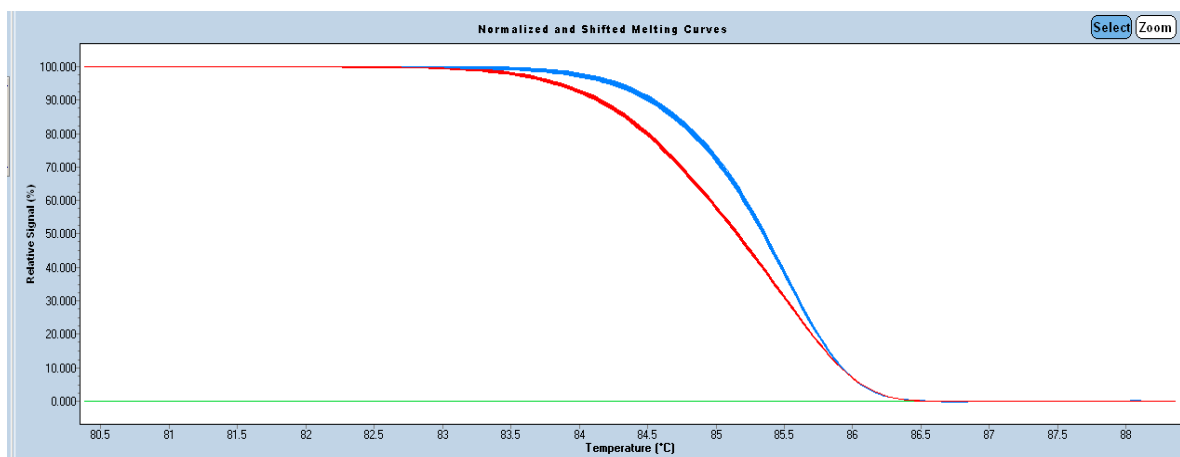
$$[GSH \text{ in } mM]_{\text{Erythrozyten}} = \frac{[GSH \text{ in } mM]_{\text{Vollblut}} \times 100}{\% \text{ Hämatokrit}}$$

### 3.2.4 Einzelnukleotidpolymorphismus-Analyse des Genotyps 5-,10-Methylenetrahydrofolatreduktase C677T

#### Prinzip des Versuchs

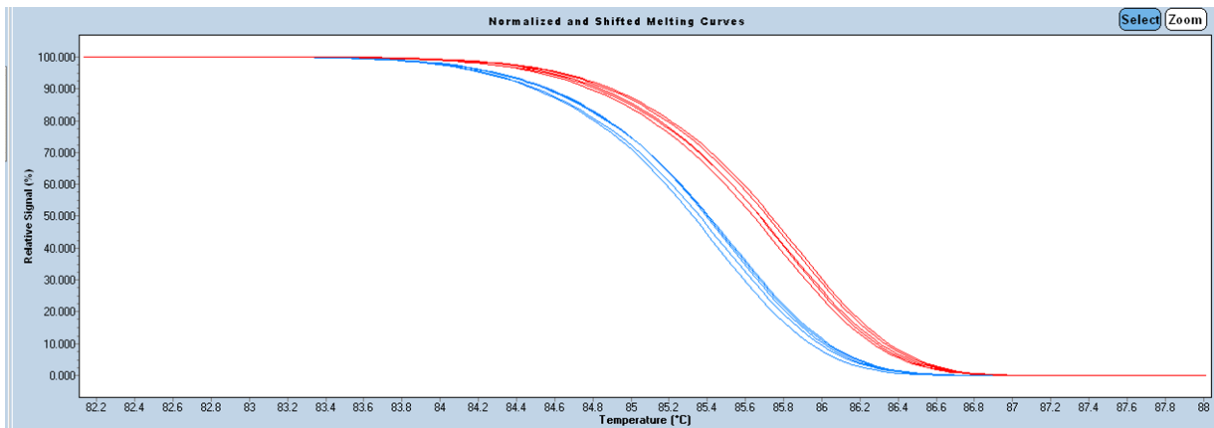
Eine günstige, schnelle und einfache Methode zur Bestimmung bekannter Mutationen ist die Desoxyribonukleinsäure- (DNA-) Schmelzkurvenanalyse (Wittwer 2009). Dabei wird vor der Polymerasenkettenreaktion (PCR) sättigend ein Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt, der mit dem doppelsträngigen Amplikon interkaliert. Nach der PCR werden die DNA-Produkte schnell aufgeschmolzen, wodurch es zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals und zu typischen Schmelzkurven kommt, die jeweils einem bestimmten Genotyp zugeordnet werden können. Da der Guanin/Cytosin-Gehalt in der DNA maßgeblich die Schmelztemperatur beeinflusst, lassen sich unbekannte Proben anhand der Form der Schmelzkurve bzw. des Schmelzzeitpunktes einem bestimmten Genotyp zuordnen (s. Abbildung 13 und Abbildung 14).

Um den Genotyp MTHFR C677T zu bestimmen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode am LightCycler® 480 Instrument (Roche, Mannheim, mit Software) etabliert. Bei dem Genotyp MTHFR 677 TT schmilzt die DNA früher als bei MTHFR 677 CC, die Schmelzkurve von CT verläuft flacher als die der homozygoten Proben. Die Exzitation des Fluoreszenzfarbstoffes erfolgt bei 494 nm und die Emission bei 521 nm.



**Abbildung 13: Typische Schmelzkurven nach dem Aufschmelzen der 5-,10-Methylenetrahydrofolatreduktase-DNA-Amplifikate homo- und heterozygoter Proben.**

Die Schmelzkurven sind nach Normalisierung und Verschiebung dargestellt. Es sind sowohl die heterozygoten als auch homozygoten Proben dargestellt. Die Proben, die als rote Schmelzkurve angezeigt werden, sind dem heterozygoten Genotyp CT zugeordnet. Die Proben der blauen Schmelzkurve sind den homozygoten Genotypen CC und TT zugeordnet. Auf der X-Achse befindet sich die Schmelztemperatur, auf der Y-Achse das relative Fluoreszenzsignal (%).



**Abbildung 14: Typische Schmelzkurven nach dem Aufschmelzen der 5-,10-Methylentetrahydrofolatreduktase-DNA-Amplifikate homozygoter Proben.**

Die Schmelzkurven sind nach Normalisierung und Verschiebung dargestellt. Es sind nur die homozygoten Proben dargestellt. Die blauen Schmelzkurven, bei denen die DNA-Amplifikate bei einer niedrigeren Temperatur schmelzen sind dem Genotypen TT zugeordnet, die roten Schmelzkurven, die bei einer höheren Temperatur schmelzen, dem Genotypen CC. Auf der X-Achse befindet sich die Schmelztemperatur, auf der Y-Achse das relative Fluoreszenzsignal (%).

### DNA-Isolierung

Aus jeweils 200 µl frischem EDTA-Vollblut wurde DNA mit dem NucleoSpin® Blood Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben isoliert. Zum Eluieren wurden 100 µl Elutionspuffer (5 mM Tris/HCl, pH 8.5) verwendet. Um die Reinheit und Konzentration der DNA-Eluate zu überprüfen, wurden sie spektralphotometrisch am NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) gemessen und mit der Software ND-1000 V 3.3.0 ausgewertet. Die DNA-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und die Reinheit über das Verhältnis 260 nm/280 nm bestimmt. Für die Genotypisierung wurden nur Proben verwendet, die einen Quotienten von  $1,8 \pm 0,2$  aufwiesen.

### PCR-Bedingungen

Für den MTHFR C677T-SNP Assay wurden 5 µl DNA mit  $c = 3 \text{ ng/}\mu\text{l}$ , also 15 ng pro Well, in 96-Well-Platten (Roche) vorgelegt. Anschließend wurden je 15 µl des Mastermixes dazugegeben. Das Pipettierschema des Mastermixes ist in Tabelle 12 dargestellt. Außer den Primern (vgl. Tabelle 11, Biomers, Ulm), sind alle weiteren Reagenzien in dem LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Roche, Mannheim) enthalten. Als Überprüfung der PCR-Bedingungen wurde eine Agarosegelelektrophorese mit einem 2 %igen Agarosegel in TBE-Puffer durchgeführt. Die PCR-Proben wurden mit BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen, Darmstadt)

versetzt (2 µl *ad* 20 µl Probe) auf das Gel neben einem Größenstandard (peqGold DNA-Sizer XII, 1:20 mit H<sub>2</sub>O verdünnt) (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) aufgetragen und bei 60 – 80 Volt für ca. 120 min aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Anfärbung des Gels für 60 min in 0,1 %iger Ethidiumbromidlösung und einem darauffolgenden Waschschrift für 30 min in H<sub>2</sub>O. Mittels UV-Licht (Imager Programm Quantity One, Bio-Rad, München) wurden die Banden sichtbar gemacht und fotografiert (nicht dargestellt).

**Tabelle 11: Primer für die Schmelzkurvenanalyse des Einzelnukleotidpolymorphismus 5-,10-Methylentetrahydrofolatreduktase C677T.**

Primer	Sequenz
Forward Primer	5'-ccc aaa ggc cac ccc gaa gc-3'
Back Primer	5'-gcc cat gtc ggt gca tgc ct-3'

**Tabelle 12: Pipettierschema des Mastermixes für die Schmelzkurvenanalyse des Einzelnukleotidpolymorphismus 5-,10-Methylentetrahydrofolatreduktase C677T.**

	Stammkonzentration	Endkonzentration	Volumen pro Well (µl)
MgCl	25 µM	2 µM	1,6
Master Mix	2-fach	1-fach	10
Forward Primer	8 µM	0,2 µM	0,5
Back Primer	8 µM	0,2 µM	0,5
Wasser			2,4
Endvolumen			15

Die Genotypisierung der Proben erfolgt in 3-fach-Bestimmung. Zuerst wurde jeweils 5 µl DNA pro Well vorgelegt, anschließend 15 µl Mastermix pro Well dazu pipettiert. Pro Platte wurden drei Negativkontrollen sowie je drei Standards CC, CT und TT pipettiert. Anschließend wurde die Platte bei 1500 g für 2 min zentrifugiert und im LightCycler® 480 analysiert. Das PCR-Programm ist in Tabelle 13 dargestellt. Die Bestimmung des Genotyps erfolgte wie in Abbildung 13 und Abbildung 14 gezeigt.

**Tabelle 13: PCR-Programm am LightCycler480 für die Schmelzkurvenanalyse des Einzelnukleotidpolymorphismus 5-,10-Methylen tetrahydrofolatreduktase C677T.**

Programm-Name	Temperatur	Dauer	Zyklen
Präinkubation	95	10 sec	1
Amplifizierung			39
	95	10 sec	
	60	15 sec	
	72	1 sec	
Aufschmelzen			1
	95	1 min	
	40	1 min	
	75	1 sec	
	95	kontinuierlich	
Kühlen	40	00:00:10	1

Die Etablierung der Genotypisierung mittels DNA-Schmelzkurvenanalyse im LightCycler® 480 Instrument (Roche) war erfolgreich und es konnten alle Probanden der Humanstudie 2 eindeutig typisiert werden. Dabei ist die Methode im Vergleich zu herkömmlichen Methoden mittels Restriktionsverdau und Auftrennung der Restriktionsfragmente auf Agarosegelen schneller und einfacher und die Färbung mit Ethidiumbromid entfällt. Die Validität der Methode wurde als ausreichend eingeschätzt, nachdem bereits bekannte Genotypen durch die Schmelzkurvenanalyse bestätigt wurden. Diese Methode ist für die Genotypisierung des SNPs MTHFR C677T geeignet.

### 3.3 Materialien

#### 3.3.1 Geräte

In Tabelle 14 sind die in der Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

**Tabelle 14: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Geräte in alphabetischer Reihenfolge.**

Gerät	Hersteller
Autosampler	Shimadzu, Duisburg
Bioelektrische Impedanzanalyse	SensorMedics, Aschaffenburg
C-18 Vorsäule (4 x 3,0 mm i.D)	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
combiscan® 100 Lesegerät	Analyticon® Biotechnologies AG, Lichtenfels
combiscreen® control	Analyticon® Biotechnologies AG, Lichtenfels
Controller SCL-10Avp	Shimadzu, Duisburg
Feinanalysenwaage Typ 1712	Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenz-Detektor	Shimadzu, Duisburg
Gelkammer Agarosegelelektrophorese	Biometra GmbH, Göttingen
klinischer Automaten Konelab	Thermo Scientific, Passau
LiChrosorb (5 µm RP-18, 125 x 4 mm i.D)	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
LightCycler® 480 inkl. Software Release 1.5.0	Roche, Mannheim
Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke, Staufen
Maßband von Seca	Seca, Hamburg
Messstation	Seca, Hamburg
Mikroliterzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Mikroliterzentrifuge Biofuge pico 21	Heraeus, Hanau

Gerät	Hersteller
Mikroplatten Reader Safire2 inkl. Software Detection Suite V 1.60	Tecan, Crailsheim
Mikroplatten Reader SOFTmax® inkl. Software SOFTmax Version 2.34	Molecular Devices, Ismaning
Mikrotiterplatten-Schüttler PMS-1000	Grant, Cambridgeshire, GB
Multipette® Stream	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop ND-1000 inkl. ND-1000 V 3.3.0 Software	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
NeoLab-Mini-Brutschrank	neoLab, Heidelberg
pH-Meter	Schott AG, Mainz
Pipetten Eppendorf research	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Gilson	Gilson, Middleton, USA
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen
Pumpen LC-Atvp	Shimadzu, Duisburg
Reinstwasseranlage Milli-Q Advantage A10	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.
Software Shimadzu ClassVp 6.12	Shimadzu, Duisburg
Spannungsgeber Agarosegelelektrophorese	Biometra GmbH, Göttingen
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Hanau
Thermostat Plus	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge EBA 21	Hettich, Tuttlingen
UV/VIS Spektrometer Lambda Bio 20 inkl. Software UV WinLab Version 1.1	Perkin Elmer, Rodgau
Vortex Genie 2T	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Wasserbad	Memmert, Büchenbach
Zentrifuge, Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau

### 3.3.2 Chemikalien und Reagenzien

In Tabelle 15 sind die in der Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien aufgelistet.

**Tabelle 15: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Chemikalien und Reagenzien in alphabetischer Reihenfolge.**

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Acetonitril	VWR, Darmstadt
Agarose	Serva, Heidelberg
Ameisensäure	Applichem GmbH, Darmstadt
BlueJuice™ Gel Loading Buffer	Invitrogen, Darmstadt
Boratpuffer, di-Natriumtetraborat	Merck KGAA, Darmstadt
ClinChek®	Recipe Chemicals + Instruments GmbH, München
DTNB	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Merck KGAA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutathionreduktase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Homocystein	Sigma-Aldrich, Steinheim
NADPH	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
peqGold DNA-Sizer XII	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$ frei)	Lonza Cologne GmbH, Köln
Primer	Biomers, Ulm
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SBD-F	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sulfosalicylsäure	Merck KGAA, Darmstadt



Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
TCA	Merck KGAA, Darmstadt
TCEP	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 3.3.3 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 16 sind die in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

**Tabelle 16: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge.**

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Halbmikroküvetten PMMA	VWR
Lightcycler 480 Multiwell Plate 96 inkl. sealing foils	Roche, Mannheim
Mikro-Schraubröhre inkl. Schraubverschlüsse (1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Monovetten EDTA (2,6 ml; 2,7ml; 9 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen ep.T.I.P.S.	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß (1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß (15 ml; 50 ml)	Corning, New York, USA
Septen	Abimed, Langenfeld
Serum-Monovetten (7,5 ml; 9 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenfilter PES	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Vials inkl. Schraubkappen	Abimed, Langenfeld

### 3.3.4 Kits

In Tabelle 17 sind die in der Arbeit verwendeten Kits aufgelistet.

**Tabelle 17: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Kits in alphabetischer Reihenfolge.**

Kit	Hersteller
Apo A1/Apo B	Microgenics GmbH, Passau
Complement C3	Microgenics GmbH, Passau
CRP high sensitive ELISA	IBL International GmbH, Hamburg (Humanstudie 2)
CRP HS ELISA	DRG Instruments, Marburg (Humanstudie 1)
GPT (ALAT)	Microgenics GmbH, Passau
Human IL-6 Immunoassay	R&D Systems GmbH, Wiesbaden- Nordenstadt
Human sICAM-1/CD54 Immunoassay	R&D Systems GmbH, Wiesbaden- Nordenstadt
Insulin ELISA	DRG Instruments, Marburg
LabAssay™ Phospholipid	WAKO Chemicals GmbH, Neuss
LightCycler® 480 High Resolution Melting Master	Roche, Mannheim
Lipoprotein (a)	Microgenics GmbH, Passau
Lipoprotein (a) Kalibrator	Microgenics GmbH, Passau
NucleoSpin® Blood Kit	Macherey-Nagel, Düren
SpeciCal	Microgenics GmbH, Passau
Specitrol	Microgenics GmbH, Passau

## 3.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS Inc. PASW 17 verwendet. Das statistische Signifikanzniveau wurde auf  $p \leq 0,05$  festgelegt. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test geprüft, die Varianzhomogenität mit dem Levene-Test.

Die Basisdaten der Gruppen vor der Intervention wurden mit einem t-Test für unabhängige Stichproben bei Normalverteilung mit Varianzhomogenität bzw. Mann-

Whitney-Rangsummentest ohne Normalverteilung und mit Varianzhomogenität verglichen. Die Interventionseffekte wurden bei normalverteilten Daten und Varianzhomogenität mit der *repeated measures* Varianzanalyse (RM-ANOVA) berechnet. Wenn die Bedingungen für die RM-ANOVA nicht erfüllt waren, wurden die Delta-Werte (Differenzbildung durch den Endwert abzüglich des Ausgangswerts) zur Analyse herangezogen und mit t-Test bzw. Mann-Whitney-Rangsummentest geprüft. Für einen Vergleich der Daten vor und nach Intervention innerhalb der Gruppen wurde bei Normalverteilung mit Varianzhomogenität ein t-Test für verbundene Stichproben genutzt bzw. der Wilcoxon-Test ohne Normalverteilung.

Für die Auswertung der MTHFR C677T-Genotypisierung wurden des Weiteren Chi-Quadrat-Tests und Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben verwendet. Um den Einfluss der Intervention auf den Homocysteinspiegel in Abhängigkeit vom Genotyp MTHFR C677T zu ermitteln, wurden vier Gruppen gebildet (Milch-PL-Gruppe und C-Allel; Milch-PL-Gruppe und T-Allel; Soja-PL-Gruppe und C-Allel; Soja-PL-Gruppe und T-Allel) und mit dem Kruskal-Wallis-H-Test geprüft.

Die Daten werden als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Humanstudie 1

In der Humanstudie 1 wurde die Wirkung von Milch-PL im Vergleich zu Milch-TG mit ähnlichem Fettsäurenmuster auf Risikoparameter für Herz-Kreislauf-Erkrankungen untersucht, indem 62 Männer über einen Zeitraum von acht Wochen täglich 200 ml Milch getrunken haben, die entweder mit 2 g Milch-PL oder mit 2 g Milch-TG angereichert wurde.

#### 4.1.1 Verträglichkeit und *Compliance*

Die Gabe von täglich 2 g Milch-PL in 200 ml Milch wurde von allen Probanden in der Interventionsgruppe gut vertragen, es wurden keine Unverträglichkeiten oder Nebenwirkungen berichtet.

Die *Compliance* der Probanden konnte nicht durch Blutparameter überprüft werden. Alle Probanden haben die Milch während der Studie zu den vereinbarten Terminen abgeholt und die Ernährungsprotokolle nach Vorschrift ausgefüllt. Kein Proband hat die Studie vorzeitig aus eigenem Wunsch verlassen. Die *Compliance* kann somit aufgrund des Verhaltens der Probanden als gut eingeschätzt werden.

#### 4.1.2 Anthropometrische und physische Messungen

Die Intervention mit täglich 2 g Milch-PL über acht Wochen reduzierte den Bauchumfang signifikant im Vergleich zur Kontrollmilch ( $p < 0,001$ ), wohingegen bei den weiteren anthropometrischen Parametern Gewicht, BMI und prozentualer Körperfettgehalt kein signifikanter Interventionseffekt nachweisbar war. In der Kontrollgruppe wurde der Puls signifikant gesenkt im Vergleich zur Milch-PL-Gruppe ( $p = 0,033$ ). Dagegen wurden der systolische und diastolische Blutdruck durch die Intervention mit Milch-PL im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant beeinflusst.

Die weitere statistische Auswertung ergab bei den Parametern BMI, Gewicht, Bauchumfang und systolischem Blutdruck eine signifikante Abnahme während des Studienzeitraums innerhalb der Milch-PL-Gruppe. Die Ergebnisse der anthropometrischen und physischen Parameter sind Tabelle 18 zu entnehmen.

**Tabelle 18: Anthropometrische und physische Parameter in der Humanstudie 1.**

Parameter	Kontrolle		Milch-PL		Interventions- effekt
	Beginn	Ende	Beginn	Ende	p-Wert
Gewicht (kg)	94,7 ± 12,6	94,5 ± 12,2	94,2 ± 7,4	93,3 ± 7,7**	n.s.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30,9 ± 2,9	30,8 ± 2,8	30,7 ± 1,9	30,4 ± 2,0**	n.s.
Bauchumfang (cm)	109,0 ± 8,1	109,1 ± 8,3	110,2 ± 6,1	108,8 ± 6,2***	< 0,001
Körperfett (%)	30,8 ± 2,4	30,3 ± 2,6	31,2 ± 2,6	30,9 ± 2,8	n.s.
Pulsfrequenz (Schläge/min)	69,4 ± 11,7	66,4 ± 8,9	64,4 ± 11,7	65,7 ± 9,9	0,033
Blutdruck					
SYS (mmHG)	131,7 ± 17,2	131,7 ± 16,4	139,6 ± 21,6	135,3 ± 19,1*	n.s.
DIA (mmHG)	82,7 ± 8,9	82,6 ± 8,9	86,4 ± 10,6	84,0 ± 11,0	n.s.

Für die Interventionseffekte (Zeit x Intervention) sind die *p*-Werte angegeben, nicht statistisch signifikante Interventionseffekte sind mit n.s. gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen sind gekennzeichnet mit \* für  $p \leq 0,05$ , \*\* für  $p \leq 0,01$ , \*\*\* für  $p \leq 0,001$ .

#### 4.1.3 Klinische Parameter

Die Intervention mit Milch-PL über acht Wochen führte zu keiner signifikanten Änderung im Cholesterinstoffwechsel (Gesamt-, HDL- und LDL-Cholesterin, Gesamt-C/HDL-C) im Vergleich zur Kontrolle. Auch bei den weiteren Lipidparametern TG, Apo A1, Apo B, Lipoprotein (a) und PL im Serum konnte kein signifikanter Einfluss durch die Gabe von Milch-PL im Vergleich zur Kontrollmilch verzeichnet werden. Die Parameter des Lipidstoffwechsels zu Beginn und am Ende des Studienzeitraums der beiden Interventionsgruppen sind in Tabelle 19 aufgelistet. Innerhalb der Milch-PL-Gruppe war ein statistisch signifikanter Anstieg von Lp(a) erkennbar.

**Tabelle 19: Konzentration (mg/dl) und Verhältnis von Serumlipiden und Lipoproteinen in der Humanstudie 1.**

Parameter	Kontrolle		Milch-PL	
	Beginn	Ende	Beginn	Ende
HDL-C	50,8 ± 13,1	50,3 ± 10,8	55,2 ± 12,9	54,7 ± 14,3
LDL-C	138,3 ± 29,4	142,3 ± 31,3	145,8 ± 31,8	148,3 ± 34,4
Gesamt-C	220,0 ± 36,2	221,0 ± 39,6	233,0 ± 31,8	227,8 ± 40,2
Gesamt-C/HDL-C	4,50 ± 1,05	4,56 ± 1,20	4,46 ± 1,23	4,40 ± 1,22
Triglyceride	124,8 ± 43,7	150,42 ± 94,7	129,3 ± 70,8	132,8 ± 56,4
Lp (a)	38,0 ± 35,2	39,4 ± 33,8	35,9 ± 37,1	44,5 ± 44,2*
Apo A1	156,2 ± 23,7	156,4 ± 21,7	164,2 ± 21,2	160,8 ± 22,6
Apo B	124,8 ± 23,3	125,8 ± 22,0	128,2 ± 26,9	126,6 ± 24,5
Phospholipide	144,8 ± 20,2	148,8 ± 28,2	156,6 ± 24,7	151,9 ± 24,8

Für die Interventionseffekte (Zeit x Intervention) sind keine *p*-Werte angegeben, da keine statistisch signifikanten Interventionseffekte vorliegen. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen sind gekennzeichnet mit \* für  $p \leq 0,05$ .

Die Parameter des Kohlenhydratstoffwechsels Insulin, Glukose und HOMA-IR wurden durch die Intervention mit Milch-PL im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant beeinflusst. Innerhalb der Kontrollgruppe war der Glukosespiegel nach der Intervention signifikant niedriger als vor der Intervention. Die Ergebnisse können der Tabelle 20 entnommen werden.

**Tabelle 20: Konzentration von Diabetes-Parametern in der Humanstudie 1.**

Parameter	Kontrolle		Milch-PL	
	Beginn	Ende	Beginn	Ende
Glukose (mg/dl)	99,3 ± 8,4	96,4 ± 7,7**	98,8 ± 11,9	97,7 ± 11,4
Insulin (μU/ml)	15,0 ± 7,4	15,5 ± 14,2	12,8 ± 7,6	13,3 ± 7,8
HOMA-IR	3,7 ± 2,0	3,7 ± 3,7	3,2 ± 2,1	3,3 ± 2,2

Für die Interventionseffekte (Zeit x Intervention) sind keine *p*-Werte angegeben, da keine statistisch signifikanten Interventionseffekte vorliegen. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen sind gekennzeichnet mit \*\* für  $p \leq 0,01$ .

Die Konzentrationen von Homocystein, IL-6, sICAM und Complement C3 wurden durch die Einnahme von Milch-PL im Vergleich zur Kontrollmilch nicht signifikant beeinflusst. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 21 aufgelistet.

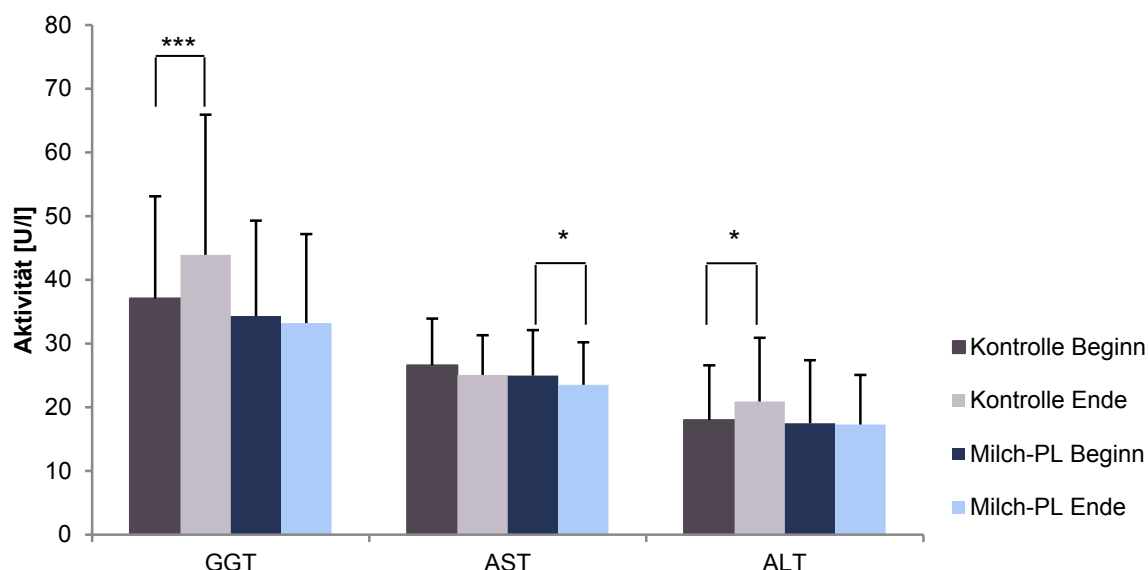
**Tabelle 21: Konzentration von Homocystein, IL-6, sICAM und Complement C3 in der Humanstudie 1.**

Parameter	Kontrolle		Milch-PL	
	Beginn	Ende	Beginn	Ende
Homocystein ( $\mu\text{mol/l}$ )	$11,7 \pm 3,2$	$11,8 \pm 3,0$	$11,6 \pm 4,0$	$12,0 \pm 3,9$
Interleukin-6 ( $\text{pg/ml}$ )	$1,62 \pm 1,5$	$1,22 \pm 0,43$	$1,34 \pm 0,77$	$1,18 \pm 0,54$
sICAM ( $\text{ng/ml}$ )	$191,1 \pm 31,5$	$187,6 \pm 29,1$	$189,9 \pm 29,3$	$183,5 \pm 25,2$
Complement C3 ( $\text{g/l}$ )	$1,37 \pm 0,19$	$1,33 \pm 0,19$	$1,39 \pm 0,19$	$1,37 \pm 0,16$

Für die Interventionseffekte (Zeit x Intervention) sind keine *p*-Werte angegeben, da keine statistisch signifikanten Interventionseffekte vorliegen. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen sind nicht vorhanden.

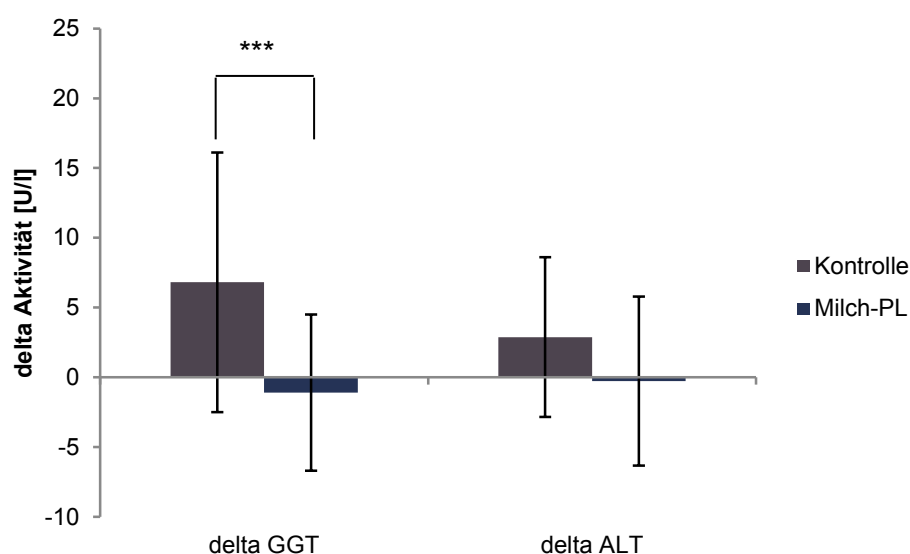
Wie in Abbildung 15 dargestellt unterschied sich in der Milch-PL-Gruppe die Aktivität der Leberenzyme GGT und ALT zu Beginn und am Ende der Studie nicht statistisch signifikant voneinander, wohingegen in dieser Gruppe ein signifikanter Unterschied zwischen Beginn und Ende der Studie bei dem Enzym AST besteht. In der Kontrollgruppe war die Aktivität der Enzyme GGT und ALT am Ende des Interventionszeitraums signifikant höher als zu Beginn. GGT stieg in der Kontrollgruppe um fast 7 U/l an, dies entspricht 18 %. Der Mittelwert lag auch nach der Intervention in dieser Gruppe innerhalb des medizinischen Referenzbereichs. Das Enzym AST wurde durch die Kontrollmilch in seiner Aktivität nicht signifikant verändert.

In Abbildung 16 ist die Veränderung der Aktivität GGT und ALT dargestellt. GGT wurde durch die Intervention mit Milch-PL im Vergleich zur Kontrolle signifikant beeinflusst, während das Enzym ALT nicht signifikant beeinflusst wurde ( $p = 0,057$ ). Bei dem Enzym AST waren keine signifikanten Interventionseffekte nachweisbar (nicht dargestellt).



**Abbildung 15: Interventionseffekte auf die Aktivität der Leberenzyme  $\gamma$ -Glutamyltransferase, Aspartat-Aminotransferase und Alanin-Aminotransferase.**

Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichungen. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen sind gekennzeichnet mit \* für  $p \leq 0,05$ , \*\* für  $p \leq 0,01$ , \*\*\* für  $p \leq 0,001$ .



**Abbildung 16: Änderung der Aktivität von  $\gamma$ -Glutamyltransferase und Alanin-Aminotransferase durch die Intervention mit Milch-Phospholipiden bzw. Kontrollmilch.**

Der Delta-Wert ist die  $\gamma$ -Glutamyltransferase-Aktivität am Ende der Studie [U/l] abzüglich der GGT-Aktivität zu Beginn der Studie [U/l]. Dargestellt sind delta-Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. \*\*\* kennzeichnet eine statistische Signifikanz von  $p \leq 0,001$ .

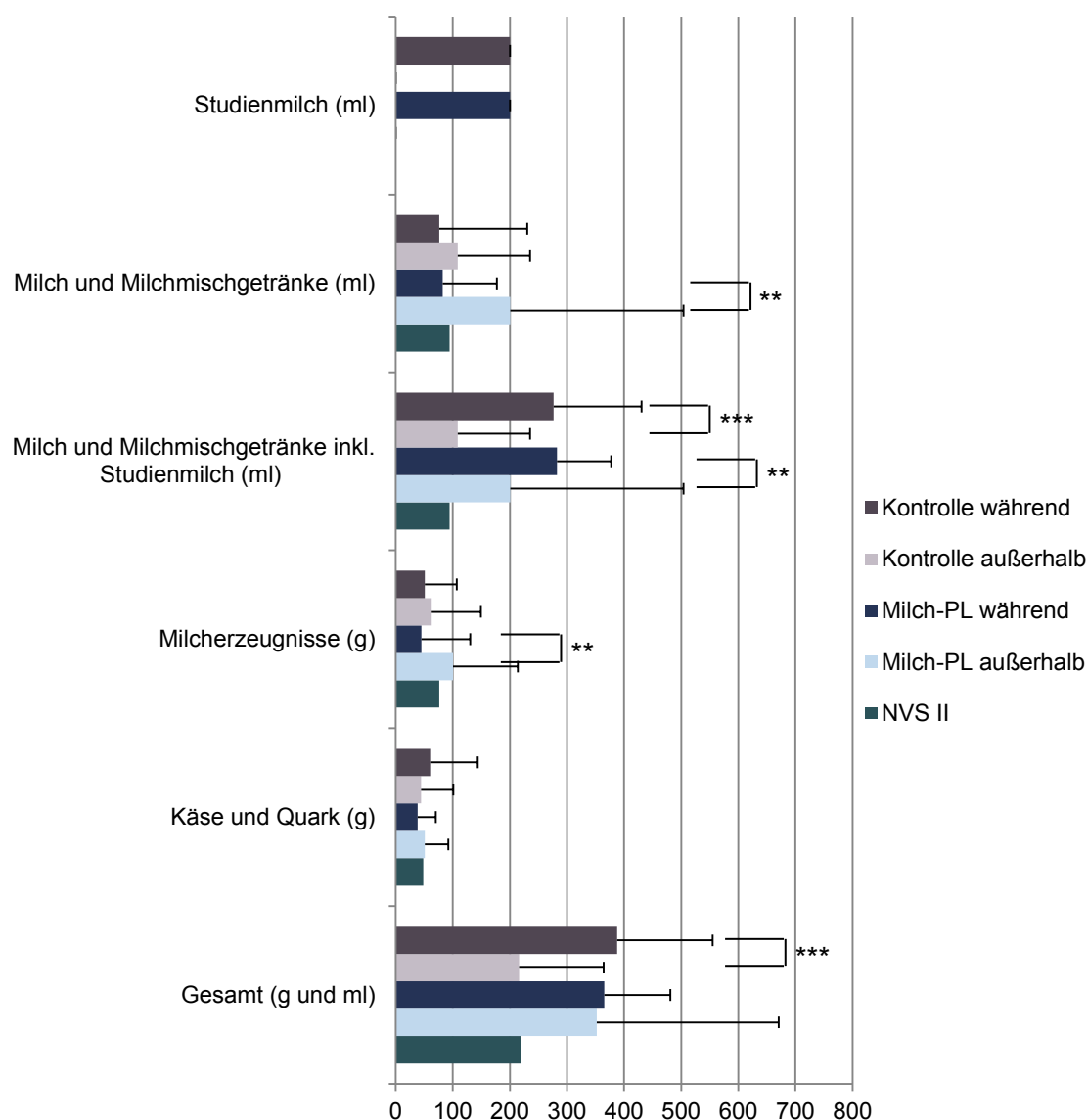


#### 4.1.4 Ernährungsprotokolle

Alle Probanden führten während und außerhalb der Studie Ernährungsprotokolle. Die Auswertung dieser 4-Tage Schätzprotokolle zeigte, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen im Verzehr von Milch und Milchmischgetränken inkl. Studienmilch, Milcherzeugnisse sowie Käse und Quark während der Studie gab.

Die Milch-PL-Gruppe hat während der Studie signifikant mehr Milch und Milchmischgetränke (inkl. Studienmilch) ( $p = 0,004$ ) sowie Milcherzeugnisse ( $p < 0,001$ ) verzehrt als außerhalb der Studie. Dabei hat die Milch-PL-Gruppe die gewöhnliche Trinkmilch durch die Studienmilch größtenteils substituiert.

Ebenso hat die Kontrollgruppe während der Studie signifikant mehr Milch und Milchmischgetränke ( $p < 0,001$ ) und insgesamt mehr Milchprodukte konsumiert ( $p < 0,001$ ) als außerhalb der Studie. Die Probanden der Kontrollgruppe haben die Studienmilch zusätzlich zur gewöhnlichen Ernährung verzehrt. Im Vergleich zu den Verzehrdaten aus der NVS II (Referenzgruppe Männer von 51 bis 64 Jahren) haben die Probanden der Humanstudie 1 vermehrt Milchprodukte während der Studie verzehrt. Außerhalb der Studie zeigte die Kontrollgruppe ein ähnliches Ernährungsmuster wie die NVS-Referenzgruppe, wohingegen die PL-Milch-Gruppe einen höheren Verzehr an Milchprodukten aufwies. Die beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

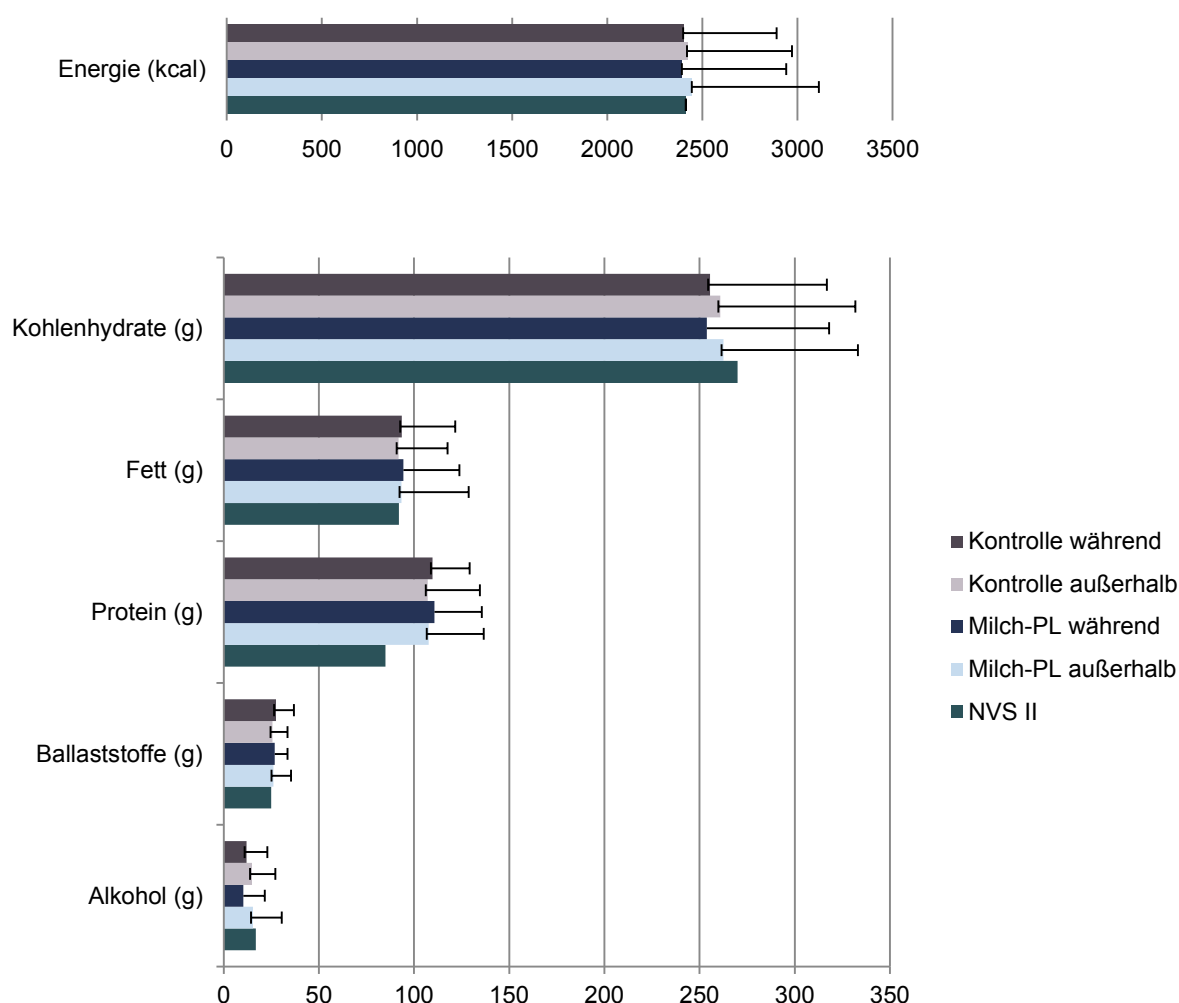


**Abbildung 17: Täglicher Verzehr von Milch und Milchprodukten während und außerhalb der Humanstudie 1.**

Vergleich mit Verzehrsdaten aus der NVS II, Männer der Altersstufe 51 – 64 Jahre. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen sind gekennzeichnet mit \*\* für  $p \leq 0,01$ , \*\*\* für  $p \leq 0,001$ .

Die tägliche Zufuhr von Nährstoffen und weiteren Lebensmittelinhaltsstoffen wurde anhand der Ernährungsprotokolle mit dem Programm PRODI® 5.7 berechnet, dem der BLS II.3 zugrunde liegt. Die Auswertung ergab eine durchschnittliche Zufuhr von täglich 94 g Fetten, 110 g Proteinen, 255 g Kohlenhydraten und insgesamt etwa 2400 kcal Energie (inkl. Studienmilch). Außerhalb der Studie protokollierten die Probanden eine durchschnittliche Zufuhr von täglich 93 g Fetten, 107 g Proteinen und 262 g Kohlenhydraten. Insgesamt nahmen die Probanden täglich im Mittel 2433 kcal Energie

und somit etwa 40 kcal mehr als während der Studie auf. Die Nährstoffzufuhr während der Studie war für beide Gruppen gleich und innerhalb der Gruppen war kein signifikanter Unterschied während und außerhalb der Studie nachweisbar. Verglichen mit den Daten aus der NVS II führten die Probanden etwas weniger Kohlenhydrate, aber mehr Proteine zu. Alle weiteren Nährstoffe sowie die Gesamtenergiezufuhr verhalten sich zur NVS II annähernd gleich. Die Auswertung der Nährstoff- und Energiezufuhr ist in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18: Durchschnittliche tägliche Energie- und Nährstoffzufuhr während und außerhalb der Humanstudie 1 inkl. Studienmilch.**

Vergleich mit Verzehrsdaten aus der NVS II, Männer (Altersstufe 51 – 64 Jahre). Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen sind nicht vorhanden.

Die weitere Auswertung der Ernährungsprotokolle mit dem Programm PRODI® ergab für die Mineralstoff- und Vitaminzufuhr sowie für einzelne Kohlenhydrate und Fettsäuren keine signifikanten Unterschiede zwischen der Phospholipid- und Kontrollgruppe (vgl. Tabelle 22 und Tabelle 23). Da für die Studienmilchen keine Daten für alle Mineralstoffe und Vitamine, einzelne Kohlenhydraten und Fettsäuren vorliegen, konnten die Milchen bei der Bestimmung der täglichen Nährstoffzufuhr nicht berücksichtigt werden.

**Tabelle 22: Durchschnittliche tägliche Zufuhr von Mineralstoffen und Vitaminen während der Humanstudie 1.**

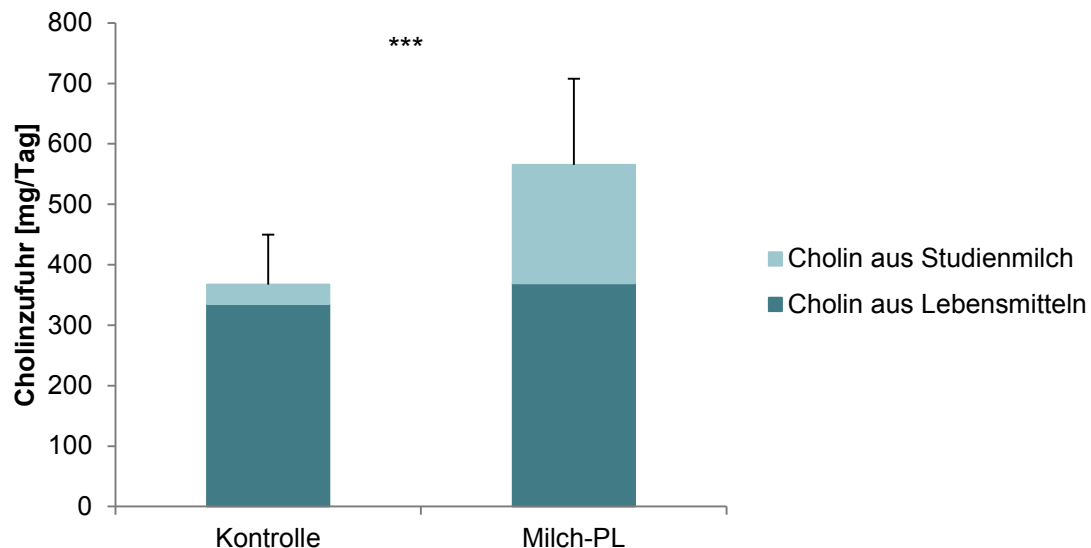
	Kontrolle	Milch-PL
<b>Mineralstoffe (mg)</b>		
Calcium	1010 ± 380	971 ± 281
Kalium	3447 ± 814	3470 ± 899
Magnesium	429 ± 80	422 ± 93
Natrium	3291 ± 1545	3813 ± 1176
Phosphor	1518 ± 292	1511 ± 386
<b>Vitamine</b>		
Folsäure (µg)	270,3 ± 74,2	290,1 ± 97,3
Vitamin B12 (µg)	7,53 ± 2,95	7,94 ± 5,61
Vitamin B6 (mg)	1,90 ± 0,41	1,93 ± 0,53

Ohne Studienmilch.

**Tabelle 23: Durchschnittliche tägliche Zufuhr einzelner Kohlenhydrate und Fettsäuren bzw. von Fettsäurengruppen und Cholesterin während der Humanstudie 1.**

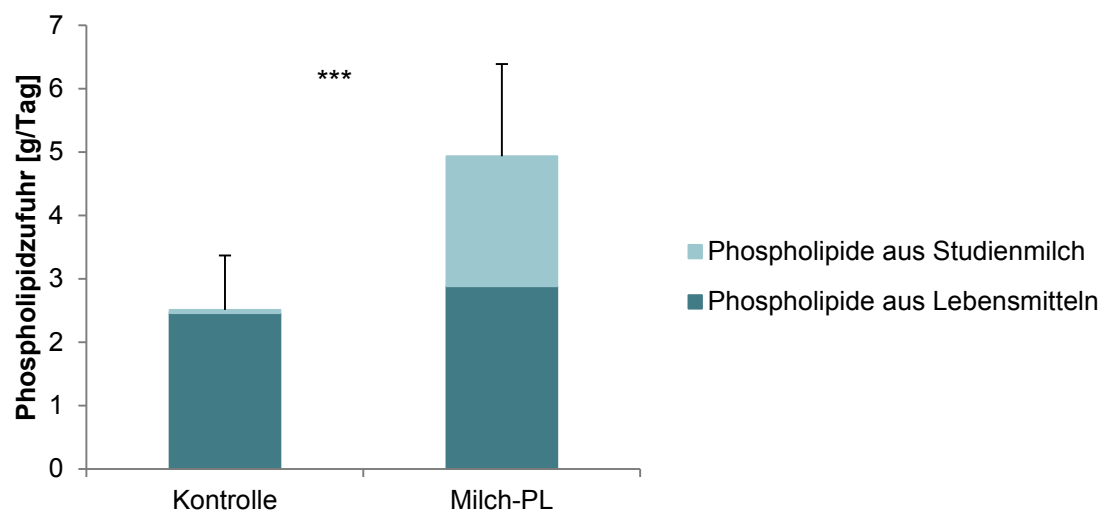
	Kontrolle	Milch-PL
<b>Einzelne Kohlenhydrate (g)</b>		
Monosaccharide	42,5 ± 22,4	39,3 ± 19,0
Glukose	18,1 ± 8,8	17,2 ± 8,7
Fruktose	23,9 ± 13,9	21,7 ± 10,6
Disaccharide	66,6 ± 32,4	67,9 ± 27,8
Saccharose	54,3 ± 29,3	56,6 ± 25,4
Laktose	9,6 ± 8,2	9,4 ± 5,5
Polysaccharide	128,1 ± 28,3	130,8 ± 43,2
Stärke	126,5 ± 28,4	129,0 ± 43,1
<b>Fettsäuren (g)</b>		
Gesättigte Fettsäuren	34,4 ± 11,7	34,9 ± 11,1
Einfach unges. Fettsäuren	32,9 ± 10,9	33,0 ± 12,2
Mehrfach unges. Fettsäuren	13,9 ± 7,1	13,8 ± 5,8
Linolsäure	11,2 ± 6,4	11,2 ± 5,1
Linolensäure	1,84 ± 0,82	1,72 ± 0,73
<b>Sterine</b>		
Cholesterin (mg)	399 ± 103	443 ± 189

Ohne Studienmilch.



**Abbildung 19: Tägliche Cholinzufuhr aus Lebensmitteln und Studienmilchen während der Humanstudie 1.**

Mit der Ernährungssoftware Prodi konnte die Zufuhr von PL und Cholin aus der Ernährung nicht bestimmt werden. Die Berechnungen erfolgten wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben. In Abbildung 19 und Abbildung 20 ist die tägliche Cholin- und PL-Zufuhr während der Humanstudie 1 dargestellt. Die mittlere Cholinzufuhr ist in der Milch-PL-Gruppe mit etwa 565 mg/Tag deutlich und signifikant ( $p < 0,001$ ) höher als in der Kontrollgruppe mit etwa 367 mg/Tag. Die adäquate Zufuhr an Cholin von 550 mg/Tag (American Institute of Medicine 2000) wird nur in der Milch-PL-Gruppe erreicht, in der Kontrollgruppe aber deutlich unterschritten. Der überwiegende Teil des Cholins in der Milch-PL-Gruppe wird aus den Lebensmitteln zur Verfügung gestellt. Die mittlere PL-Zufuhr ist in der Milch-PL-Gruppe doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe, dieser Unterschied ist ebenfalls signifikant ( $p < 0,001$ ). Dabei stammen etwa 3/5 der PL-Zufuhr in der Milch-PL-Gruppe aus Lebensmitteln und 2/5 aus der Studienmilch.



**Abbildung 20: Tägliche Phospholipidzufuhr aus Lebensmitteln und Studienmilch während der Humanstudie 1.**

## 4.2 Ergebnisse der Humanstudie 2

In der Humanstudie 2 wurde die Wirkung einer siebenwöchigen Intervention mit täglich 2,8 g Soja-PL in 250 ml Milch mit der Wirkung von 3 g Milch-PL in 250 ml Milch auf Risikoparameter für Herz-Kreislauf-Erkrankungen verglichen. Insgesamt wurden die Daten von 57 Probanden ausgewertet.

### 4.2.1 Verträglichkeit und *Compliance*

Die Gabe von täglich 2,8 g Soja-PL in 250 ml Milch wurde von allen Probanden der Gruppe gut vertragen, es wurden keine Unverträglichkeiten oder Nebenwirkungen berichtet. Ein Proband berichtete Unverträglichkeiten nach dem Verzehr von 3 g Milch-PL in 250 ml Milch, ob ein ursächlicher Zusammenhang zwischen dem Verzehr der angereicherten Milch und der Unverträglichkeit bestand, blieb jedoch offen. Alle anderen Probanden berichteten keine Unverträglichkeiten oder Nebenwirkungen.

Auch in der Humanstudie 2 konnte die Probandencompliance nicht durch Blutparameter überprüft werden. Alle Probanden haben die Ernährungsprotokolle nach Vorschrift ausgefüllt. Kein Proband hat die Studie vorzeitig aus eigenem Wunsch verlassen. Die *Compliance* kann deshalb als gut eingeschätzt werden.

### 4.2.2 Anthropometrische und physische Messungen

Durch die Intervention mit Soja-PL im Vergleich zu Milch-PL wurden Körpergewicht, BMI, Bauchumfang und Körperfettgehalt nicht statistisch signifikant verändert. Auch bei dem systolischen und diastolischen Blutdruck sowie Puls wurden keine signifikant unterschiedlichen Interventionseffekte festgestellt. Allerdings hat innerhalb der Milch-PL-Gruppe der Körperfettgehalt statistisch signifikant abgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 aufgelistet.



**Tabelle 24: Anthropometrische und physische Parameter in der Humanstudie 2.**

Parameter	Soja-PL (n = 29)		Milch-PL (n = 28)	
	Beginn	Ende	Beginn	Ende
Gewicht (kg)	91,0 ± 8,6	90,5 ± 9,8	95,6 ± 10,4	95,4 ± 10,3
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30,2 ± 2,6	30,0 ± 2,8	30,6 ± 2,3	30,6 ± 2,3
Bauchumfang (cm)	107,3 ± 6,6	107,7 ± 6,8	109,1 ± 6,2	109,4 ± 6,4
Körperfett (%)	30,9 ± 2,5	30,5 ± 2,4	31,2 ± 3,3	30,5 ± 2,8*
Pulsfrequenz (Schläge/min)	67,2 ± 8,9	66,7 ± 9,2	65,6 ± 12,4	65,6 ± 12,1
Blutdruck				
DIA (mmHG)	91,2 ± 8,6	91,3 ± 7,8	91,0 ± 11,7	92,3 ± 12,7
SYS (mmHG)	144,1 ± 18,6	143,9 ± 16,6	139,6 ± 17,5	140,1 ± 19,8

Für die Interventionseffekte (Zeit x Intervention) sind keine *p*-Werte angegeben, da keine statistisch signifikanten Interventionseffekte vorliegen. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen sind gekennzeichnet mit \* für  $p \leq 0,05$ .

#### 4.2.3 Klinische Parameter

Die siebenwöchige Gabe von 2,8 g Soja-PL pro Tag hat den Cholesterinstoffwechsel (Gesamt-C, HDL-C und LDL-C sowie das Verhältnis Gesamt-C/HDL-C) im Vergleich zur Gabe von 3 g Milch-PL pro Tag nicht statistisch signifikant verändert. Auch bei den weiteren Lipidparametern TG, Apo A1, Apo B, Lipoprotein (a) und den Phospholipiden im Serum wurden keine signifikanten Interventionseffekte beobachtet. Innerhalb der Milch-PL-Gruppe wurde die Gesamt-C-Konzentration signifikant gesenkt. Die Ergebnisse sind Tabelle 25 zu entnehmen.

Die Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels sind in Tabelle 26 dargestellt. Es gab keine signifikanten Interventionseffekte auf Insulinspiegel, Glukosespiegel und HOMA-IR als Maßzahl für die Insulinsensitivität. Der Glukosespiegel war in der Milch-PL-Gruppe zu Beginn der Studie signifikant höher als nach der Studie.

**Tabelle 25: Konzentration (mg/dl) und Verhältnis von Serumlipiden und Lipoproteinen in der Humanstudie 2.**

Parameter	Soja-PL (n = 29)		Milch-PL (n = 28)	
	Beginn	Ende	Beginn	Ende
HDL-C	50,6 ± 12,2	50,7 ± 10,4	50,9 ± 10,8	52,8 ± 10,7
LDL-C	138,1 ± 26,5	141,0 ± 24,3	148,1 ± 29,2	146,6 ± 33,6
Gesamt-C	210,8 ± 32,3	207,8 ± 29,8	221,6 ± 35,4	214,7 ± 42,8*
Gesamt-C/HDL-C	4,36 ± 1,04	4,22 ± 0,80	4,46 ± 0,78	4,14 ± 0,80
Triglyceride	130,3 ± 59,5	137,0 ± 47,9	132,8 ± 50,8	133,7 ± 46,8
Lp (a)	37,6 ± 34,1	40,1 ± 39,6	49,8 ± 48,3	50,9 ± 48,2
Apo A1	161,1 ± 22,1	159,4 ± 19,7	163,4 ± 20,1	163,4 ± 21,8
Apo B	132,5 ± 21,9	135,1 ± 19,7	140,8 ± 20,2	138,4 ± 25,5
Phospholipide	168,4 ± 27,6	170,7 ± 27,1	172,2 ± 25,4	174,8 ± 31,5

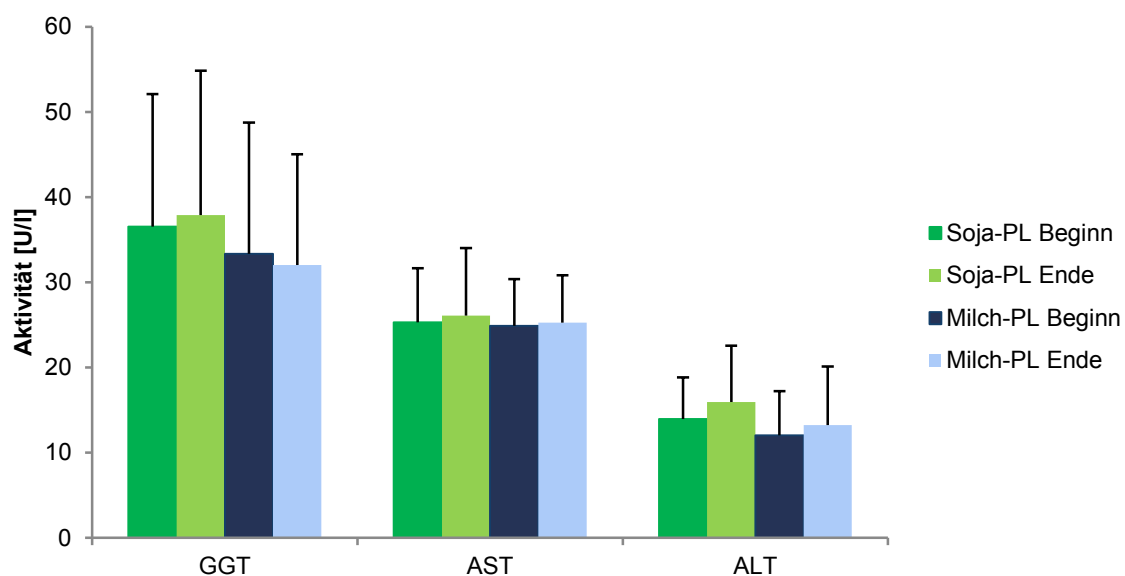
Für die Interventionseffekte (Zeit x Intervention) sind keine *p*-Werte angegeben, da keine statistisch signifikanten Interventionseffekte vorliegen. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen sind gekennzeichnet mit \* für  $p \leq 0,05$ .

**Tabelle 26: Konzentration Diabetes-Parametern in der Humanstudie 2.**

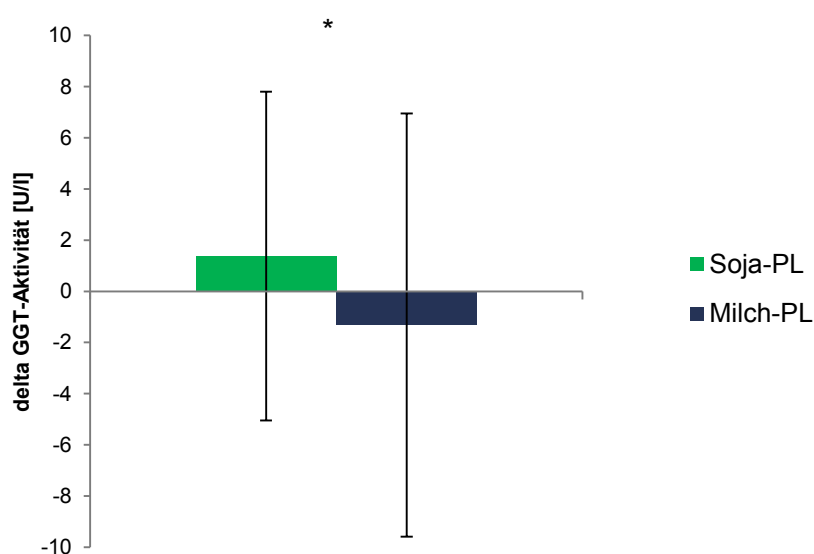
Parameter	Soja-PL (n = 29)		Milch-PL (n = 28)	
	Beginn	Ende	Beginn	Ende
Glukose (mg/dl)	98,1 ± 8,9	96,0 ± 6,5	98,0 ± 10,7	93,7 ± 10,3**
Insulin (µU/ml)	11,8 ± 4,8	11,6 ± 4,0	11,6 ± 8,1	11,5 ± 6,2
HOMA-IR	2,90 ± 1,3	2,76 ± 1,0	2,77 ± 1,8	2,66 ± 1,5

Für die Interventionseffekte (Zeit x Intervention) sind keine *p*-Werte angegeben, da keine statistisch signifikanten Interventionseffekte vorliegen. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen sind gekennzeichnet mit \*\* für  $p \leq 0,01$ .

Bei dem Leberenzym GGT, nicht aber bei AST und ALT, wurde ein signifikanter Interventionseffekt nachgewiesen ( $p = 0,042$ ) (s. Abbildung 22), in der Milch-PL-Gruppe nahm die mittlere GGT-Aktivität ab und in der Soja-PL-Gruppe zu (s. Abbildung 21 und Abbildung 22). Innerhalb der Milch-PL-Gruppe und Soja-PL-Gruppe wurden keine signifikanten Änderungen in den Leberenzymaktivitäten gezeigt (s. Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Aktivität der Leberenzyme  $\gamma$ -Glutamyltransferase, Aspartat-Aminotransferase und Alanin-Aminotransferase vor und nach Intervention in der Humanstudie 2.



**Abbildung 22:** Änderung der Leberenzyme  $\gamma$ -Glutamyltransferase-Aktivität durch die Intervention mit Milch-Phospholipide bzw. Soja-Phospholipide.

Der Delta-Wert ist die  $\gamma$ -Glutamyltransferase-Aktivität am Ende der Studie [U/l] abzüglich der  $\gamma$ -Glutamyltransferase-Aktivität zu Beginn der Studie [U/l].

In Tabelle 27 sind die Interventionseffekte auf die weiteren Parameter GSH, Homocystein, hsCRP, IL-6 und sICAM aufgelistet. Auch diese Parameter wurden durch

die Einnahme von Soja-PL im Vergleich zu Milch-PL nicht signifikant beeinflusst. Es war ein statistisch signifikanter Anstieg des IL-6 innerhalb der Milch-PL-Gruppe nachweisbar.

**Tabelle 27: Konzentration von GSH, Homocystein, hsCRP, IL-6 und sICAM und in der Humanstudie 2.**

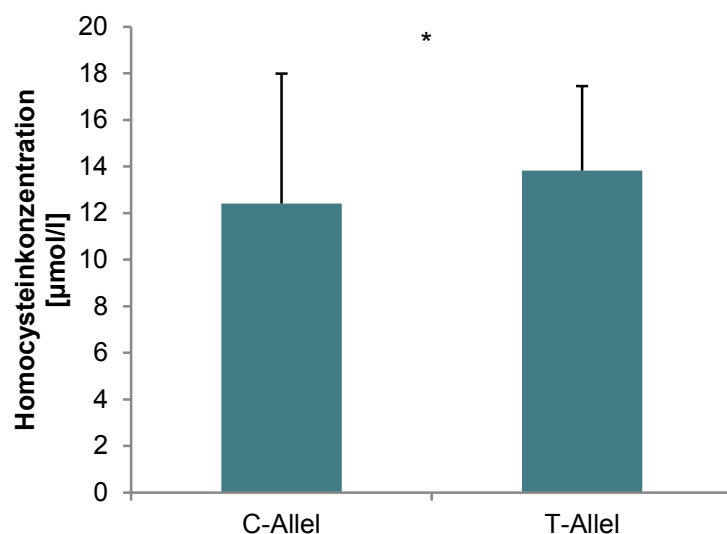
Parameter	Soja-PL (n = 29)		Milch-PL (n = 28)	
	Beginn	Ende	Beginn	Ende
GSH (mmol/l Erythrozyt)	1,52 ± 0,30	1,52 ± 0,29	1,57 ± 0,33	1,61 ± 0,37
Homocystein (µmol/l)	13,9 ± 5,0	13,7 ± 4,7	12,5 ± 4,0	12,4 ± 3,5
hsCRP (mg/l)	2,43 ± 2,09	2,80 ± 2,75	2,62 ± 2,59	2,17 ± 1,70
Interleukin-6 (pg/ml)	1,59 ± 0,86	1,74 ± 1,16	1,33 ± 0,77	1,45 ± 0,65*
sICAM (ng/ml)	211 ± 35	206 ± 37	199 ± 38	197 ± 35

Für die Interventionseffekte (Zeit x Intervention) sind keine *p*-Werte angegeben, da keine statistisch signifikanten Interventionseffekte vorliegen. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen sind gekennzeichnet mit \* für  $p \leq 0,05$ .

#### 4.2.4 Einzelnukleotidpolymorphismus-Analyse

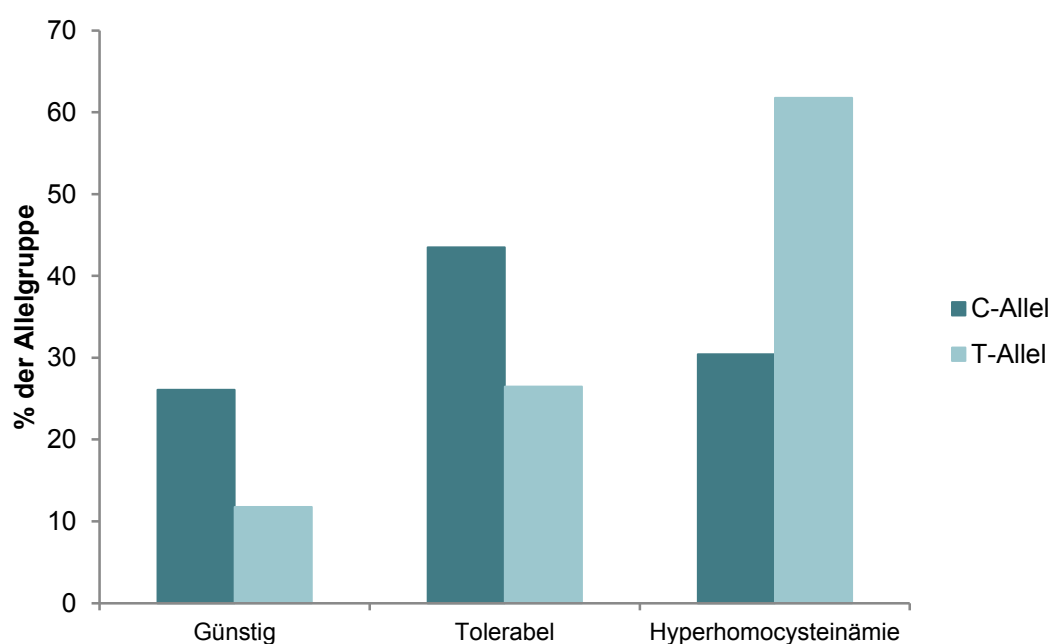
Mit der Schmelzkurvenanalyse wurde eine schnelle und einfache Methode etabliert, um den Genotyp MTHFR C677T zu bestimmen (vgl. Abschnitt 3.2.4). Damit konnte der SNP bei allen Probanden der Humanstudie 2 eindeutig typisiert werden. Von den 57 Probanden wiesen 23 (40 %) den homozygoten Wildtyp CC, 32 (56 %) den heterozygoten CT Genotyp und zwei (4 %) die homozygote Mutation TT auf, sodass die berechnete Allelfrequenz für C 68 % und für T 32 % beträgt. Die Verteilung der Genotypen im Kollektiv unterscheidet sich statistisch signifikant ( $\chi^2 = 0,77$ ,  $p < 0,05$ ) vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (berechnet nach Rodriguez *et al* (2009)).

Da nur zwei Probanden den Genotyp MTHFR C677TT aufwiesen, wurden diese nachfolgend mit den Probanden des Genotyps MTHFR 677CT betrachtet und wurden als T-Allel-Gruppe zusammengefasst (n = 34). Die Probanden mit dem Genotyp MTHFR 677CC wurden als C-Allel-Gruppe bezeichnet (n = 23). Um den Einfluss des Genotyps auf die Homocysteinkonzentration zu ermitteln, wurden die Homocysteinkonzentrationen beider Gruppen zu Beginn der Studie miteinander verglichen. Wie in Abbildung 23 dargestellt haben Probanden mit dem C-Allel zu Beginn der Studie eine signifikant niedrigere Homocysteinkonzentration als Probanden mit dem T-Allel ( $p = 0,037$ ).



**Abbildung 23: Homocysteinkonzentration im Plasma bei Probanden mit C-Allel bzw. T-Allel.**

Berechnet mit Kruskal-Wallis-Test, statistische Signifikanz bei  $p \leq 0,05$  wird mit \* gekennzeichnet.

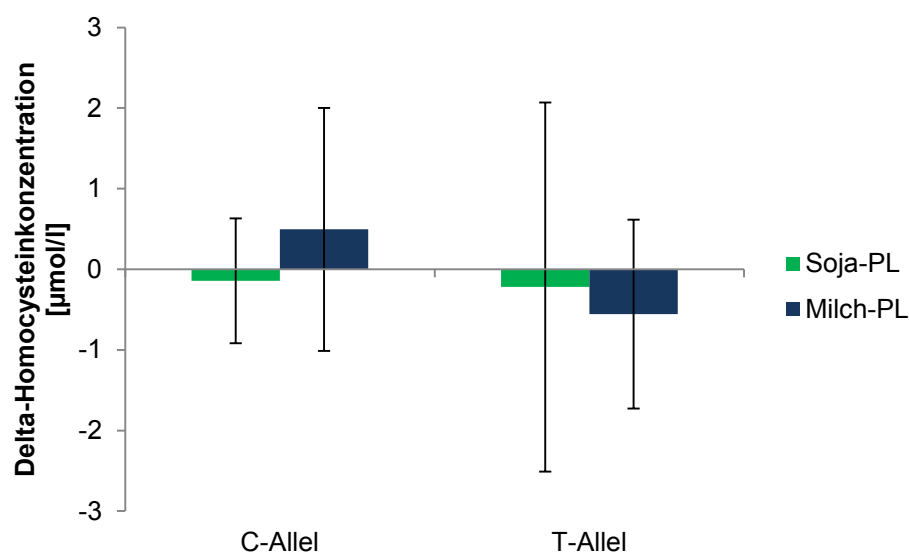


**Abbildung 24: Einteilung der Allelgruppen in Homocysteinbereiche zu Beginn der Humanstudie 2.**

Günstig: Plasma Homocysteinkonzentration < 10 µmol/l, Tolerabel: Plasma Homocysteinkonzentration 10 - 12 µmol/l, Hyperhomocysteinämie: Plasma Homocysteinkonzentration > 12 µmol/l. Statistische Auswertung mit Chi-Quadrat-Test,  $p = 0,063$ . Die Einteilung ist in Prozent der Allelgruppe dargestellt.

Anschließend wurden die Probanden der beiden Allelgruppen aufgrund ihrer Homocysteinkonzentrationen in die Homocysteinbereiche nach Stanger *et al.* (2003) eingeteilt. 26 % der Probanden mit dem C-Allel haben einen günstigen Homocysteinspiegel ( $< 10 \mu\text{mol/l}$  Plasma), bei dem kein Therapiebedarf besteht, dagegen nur 12 % der Probanden mit einem T-Allel. Einen tolerablen Homocysteinspiegel ( $10 - 12 \mu\text{mol/l}$ ), der beim Auftreten weiterer Risikofaktoren therapiert werden sollte, haben 44 % der Probanden mit C-Allel und 27 % mit T-Allel. Eine (moderate) Hyperhomocysteinämie ab  $12 \mu\text{mol/l}$ , bei der uneingeschränkter Therapiebedarf besteht, wurde bei 30 % der Probanden mit einem C-Allel diagnostiziert, und bei 62 % der Probanden mit einem T-Allel (Abbildung 24). Die statistische Auswertung deutet an, dass die Verteilung der Allelgruppen auf die Homocysteinbereiche nicht zufällig ist ( $\chi^2 = 5,536$ ;  $p = 0,063$ ).

Um zu prüfen, ob sich die Intervention mit Soja- bzw. Milch-PL in den beiden Allelgruppen unterschiedlich auf die Plasma-Homocysteinkonzentration auswirkt, wurde im Anschluss eine multifaktorielle Analyse durchgeführt. Wie in Abbildung 25 dargestellt, sind keine signifikanten Interventionseffekte in Abhängigkeit vom Genotyp vorhanden.



**Abbildung 25: Delta-Homocysteinkonzentration bei unterschiedlichen Genotypen (C-Allelgruppe bzw. T-Allelgruppe).**

Der Delta-Wert ist die Homocysteinkonzentration am Ende der Studie [ $\mu\text{mol/l}$ ] abzüglich der Homocysteinkonzentration zu Beginn der Studie [ $\mu\text{mol/l}$ ]. Dargestellt ist die mittlere Veränderung  $\pm$  SD der Plasmakonzentration in der Humanstudie 2 durch die Intervention mit Soja-PL bzw. Milch-PL.

#### 4.2.5 Ernährungsprotokolle

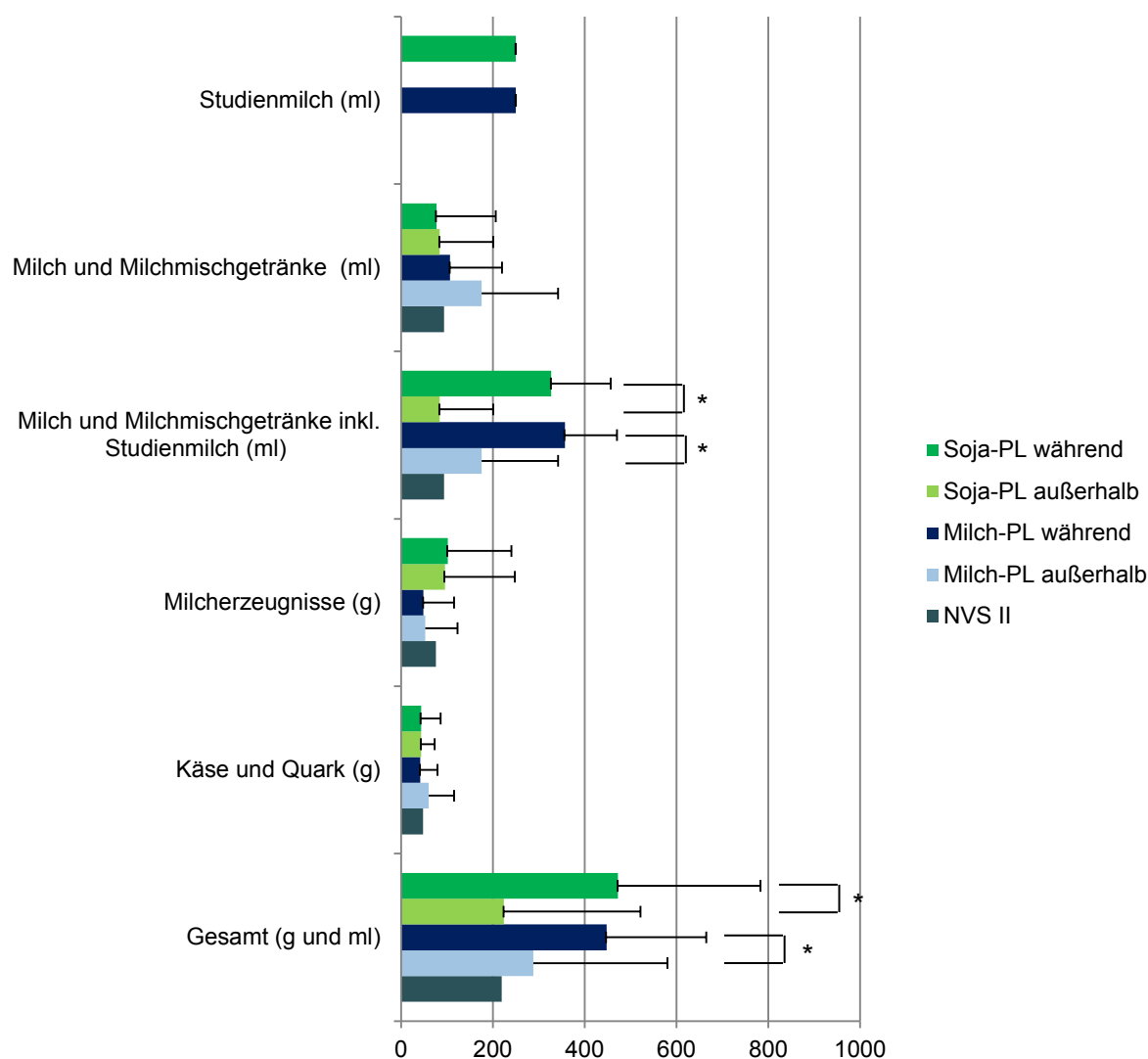
Auch in der Humanstudie 2 führten alle Probanden während und außerhalb der Studie Ernährungsprotokolle. Die Auswertung dieser 4-Tage Schätzprotokolle ist in Abbildung 26 dargestellt.

Im Mittel über beide Gruppen verzehrten die Probanden täglich etwa 43 g Käse und Quark und 340 g Milch und Milchmischgetränke inkl. Studienmilch. Die beiden Interventionsgruppen unterschieden sich im Verzehr dieser Lebensmittelgruppen nicht signifikant voneinander. Dagegen zeigten die Probanden der Soja-PL-Gruppe mit 102 g/Tag einen mehr als doppelt so hohen Verzehr von Milcherzeugnissen als die Probanden der Milch-PL-Gruppe mit 49 g/Tag, jedoch war dieser Unterschied ebenfalls nicht signifikant. In der Summe verzehrten die Interventionsgruppen in etwa gleich viele Milch- und Milchprodukte (Soja-PL-Gruppe = 473 g, Milch-PL-Gruppe = 449 g).

Die Soja-PL-Gruppe verzehrte während und außerhalb der Studie gleich viel Käse und Quark sowie Milcherzeugnisse, aber signifikant ( $p < 0,001$ ) mehr Milch und Milchmischgetränke (inkl. Studienmilch) während der Studie (327 ml/Tag) als außerhalb der Studie (84 ml/Tag) und nahm die Studienmilch zusätzlich zur gewohnten Ernährung auf. Auch der Gesamtverzehr an Milch und Milchprodukten war in dieser Gruppe während der Studie mit 473 g/Tag deutlich und signifikant ( $p \leq 0,001$ ) höher als außerhalb der Studie mit 224 g/Tag.

Die Probanden der Milch-PL-Gruppe führten während der Studie etwas weniger Käse und Quark (während 43 g/Tag, außerhalb 59 g/Tag) sowie Milcherzeugnisse (während 49 g/Tag, außerhalb 53 g/Tag) zu sich als außerhalb der Studie, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Auch in dieser Gruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) im Verzehr von Milch und Milchmischgetränken (inkl. Studienmilch) während der Studie (357 ml/Tag) und außerhalb der Studie (176 ml/Tag) sowie im Gesamtverzehr von Milch und Milchprodukten während (449 g/Tag) und außerhalb der Studie (287 g/Tag) ( $p < 0,001$ ).

Der Lebensmittelverzehr der Studienteilnehmer außerhalb der Studie waren verglichen mit der NVS II Referenzgruppe (Männer von 51 bis 64 Jahren) in Bezug auf Milch und Milchprodukte normal, wohingegen die Studienteilnehmer während der Studie mehr Milch und Milchprodukte verzehrten.



**Abbildung 26: Täglicher Verzehr von Milch und Milchprodukten während und außerhalb der Humanstudie 2.**

Vergleich mit Verzehrdaten aus der NVS II, Männer der Altersstufe 51 – 64 Jahre. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen sind gekennzeichnet mit \* für  $p \leq 0,05$ , \*\* für  $p \leq 0,01$ , \*\*\* für  $p \leq 0,001$ .

Der tägliche Verzehr von Nährstoffen und weiterer Lebensmittelinhaltsstoffe wurde auf Basis der Ernährungsprotokolle mit dem Programm PRODI® 5.9 berechnet, dem der BLS 3.01 zugrunde liegt. Die Auswertung zeigte, dass sich die beiden Interventionsgruppen in der Fett- und Proteinzufuhr nicht signifikant unterschieden, wohingegen die Zufuhr an Kohlenhydraten und Energie in der Soja-PL-Gruppe signifikant höher war als in der Milch-PL-Gruppe ( $p = 0,034$ ).

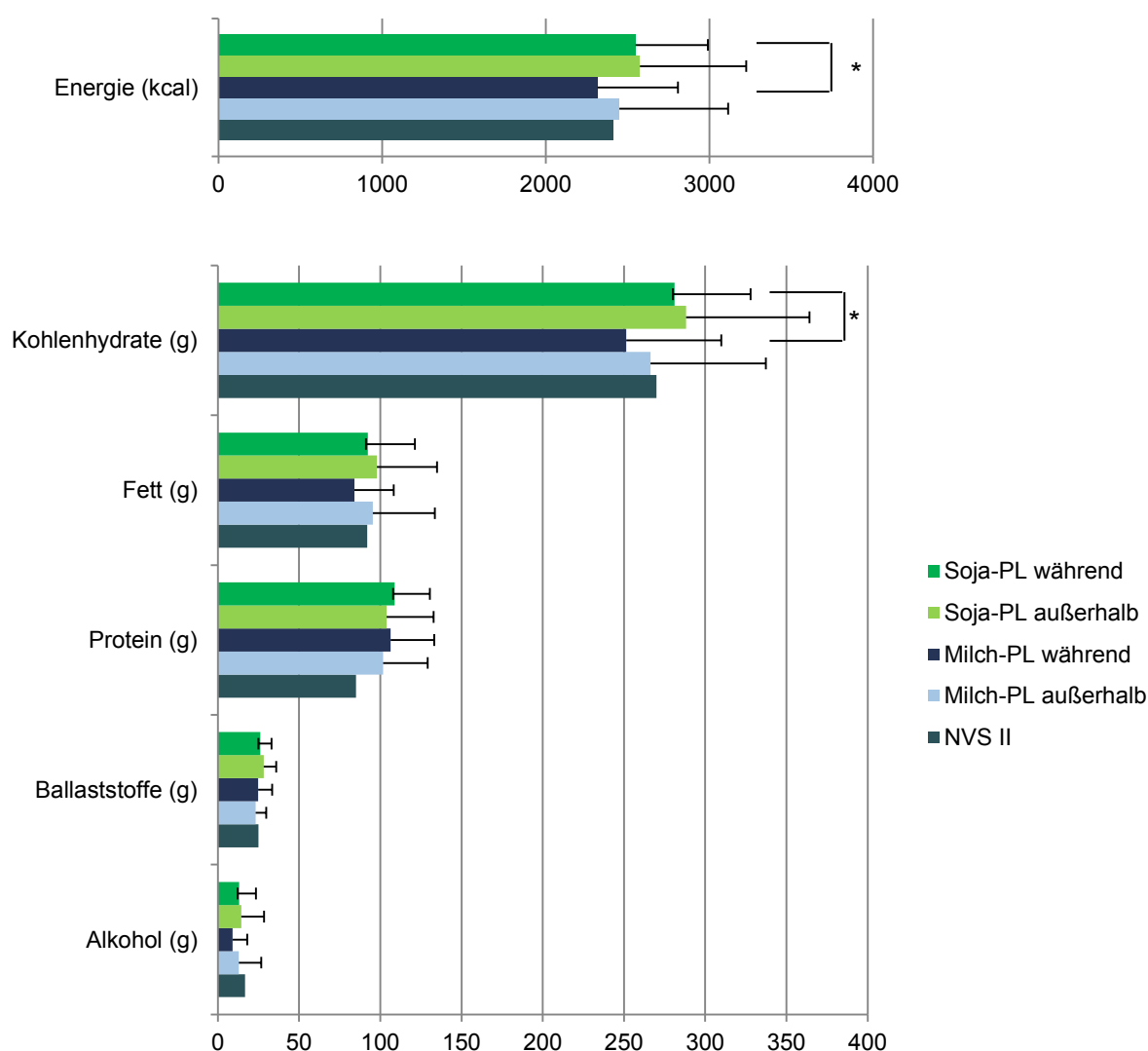
Die Probanden der Soja-PL-Gruppe verzehrten während der Studie täglich etwa 96 g Fett, 281 g Kohlenhydrate, 109 g Proteine und 2548 kcal Energie. Während der Studie zeigte die Soja-PL-Gruppe eine um 133 kcal niedrigere Energiezufuhr als außerhalb der



Studie, dieser Unterschied ist aber nicht signifikant. Die Zufuhr der Nährstoffe während der Studie unterschied sich ebenfalls nicht signifikant von der Zufuhr außerhalb der Studie.

In der Milch-PL-Gruppe führten die Probanden täglich etwa 88 g Fett, 251 g Kohlenhydrate, 106 g Proteine und 2316 kcal Energie zu, auch diese Zufuhr unterschied sich nicht signifikant von der Zufuhr außerhalb der Studie.

Verglichen mit den Daten aus der NVS II führten die Probanden mehr Proteine zu, alle weiteren Nährstoffe sowie die Gesamtenergiezufuhr verhielten sich annähernd gleich. Die Auswertung der Nährstoff- und Energiezufuhr ist in Abbildung 29 dargestellt.



**Abbildung 27: Durchschnittliche tägliche Energie- und Nährstoffzufuhr während und außerhalb der Humanstudie 2.**

Vergleich mit Verzehrsdaten aus der NVS II, Männer der Altersstufe 51 – 64 Jahre. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen sind gekennzeichnet mit \* für  $p \leq 0,05$ , \*\* für  $p \leq 0,01$ , \*\*\* für  $p \leq 0,001$ .

Die weitere Auswertung der Ernährungsprotokolle mit dem Programm PRODI® ergab für die Mineralstoff- und Vitaminzufuhr sowie für einzelne Kohlenhydrate und Fettsäuren keine statistisch signifikanten Unterschiede während der Studie zwischen der Soja-PL-Gruppe und Milch-PL-Gruppe. Die durchschnittliche tägliche Zufuhr ist in Tabelle 28 und Tabelle 29 aufgelistet. Da auch für die Studienmilchen der Humanstudie 2 keine Daten aller Mineralstoffe und Vitamine, einzelne Kohlenhydraten und Fettsäuren vorliegen, konnten die Milchen bei der Bestimmung der Nährstoffzufuhr nicht berücksichtigt werden.

**Tabelle 28: Tägliche Energie- und Nährstoffzufuhr während der Humanstudie 2.**

	Soja-PL (n = 29)	Milch-PL (n = 28)
<b>Kohlenhydrate (g)</b>		
Monosaccharide		
Glukose	25,0 ± 13,0	19,9 ± 10,7
Fruktose	29,4 ± 14,7	22,8 ± 12,4
Galaktose	0,49 ± 0,68	0,21 ± 0,27
Disaccharide		
Saccharose	55,2 ± 23,6	49,5 ± 21,9
Laktose	11,1 ± 8,5	10,6 ± 4,9
Polysaccharide		
Stärke	135,8 ± 28,9	127,1 ± 39,7
<b>Fettsäuren (g)</b>		
Gesättigte Fettsäuren	37,8 ± 11,8	35,6 ± 11,9
Einfach unges. Fettsäuren	32,6 ± 12,3	28,3 ± 9,3
Mehrfach unges. Fettsäuren	12,7 ± 5,7	11,6 ± 3,1
Linolsäure	10,2 ± 4,6	9,2 ± 2,5
Linolensäure	1,69 ± 1,00	1,37 ± 0,42
<b>Sterine</b>		
Cholesterin (mg)	424 ± 144	464 ± 291

Ohne Studienmilch.

Die Berechnungen der PL- und Cholinzufuhr über die Ernährung erfolgte wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben. Wie Abbildung 28 zu entnehmen, ist die tägliche Cholinzufuhr während der Studie in der Soja-PL-Gruppe geringfügig niedriger als in der Milch-PL-Gruppe. Dieser Unterschied war signifikant ( $p = 0,01$ ). Etwas mehr als die Hälfte des

Cholins stammte aus Lebensmitteln. In Abbildung 29 ist die tägliche PL-Zufuhr während der Humanstudie 2 dargestellt. Die PL-Zufuhr unterschied sich in der Soja-PL-Gruppe nicht signifikant von der Milch-PL-Gruppe. Auch hier entstammte etwas weniger als die Hälfte der täglichen PL-Zufuhr aus der Nahrung.

**Tabelle 29: Tägliche Mineralstoff- und Vitaminzufuhr während der Humanstudie 2.**

	Soja-PL (n = 29)	Milch-PL (n = 28)
<b>Mineralstoffe (mg)</b>		
Calcium	904 ± 267	946 ± 276
Kalium	3566 ± 780	3461 ± 926
Magnesium	396 ± 83	378 ± 77
Natrium	3658 ± 930	3264 ± 1079
Phosphor	1524 ± 290	1551 ± 349
<b>Vitamine</b>		
Folsäure (µg)	359 ± 100	351 ± 192
Vitamin B12 (µg)	7,3 ± 4,7	9,1 ± 9,6
Vitamin B6 (mg)	1,9 ± 0,6	1,9 ± 0,5
α-Tocopherol (mg)	12,9 ± 4,7	11,8 ± 4,6
Retinoläquivalent (mg)	2,13 ± 2,14	3,30 ± 6,37
Vitamin D (µg)	4,93 ± 3,33	4,59 ± 3,78

Ohne Studienmilch.

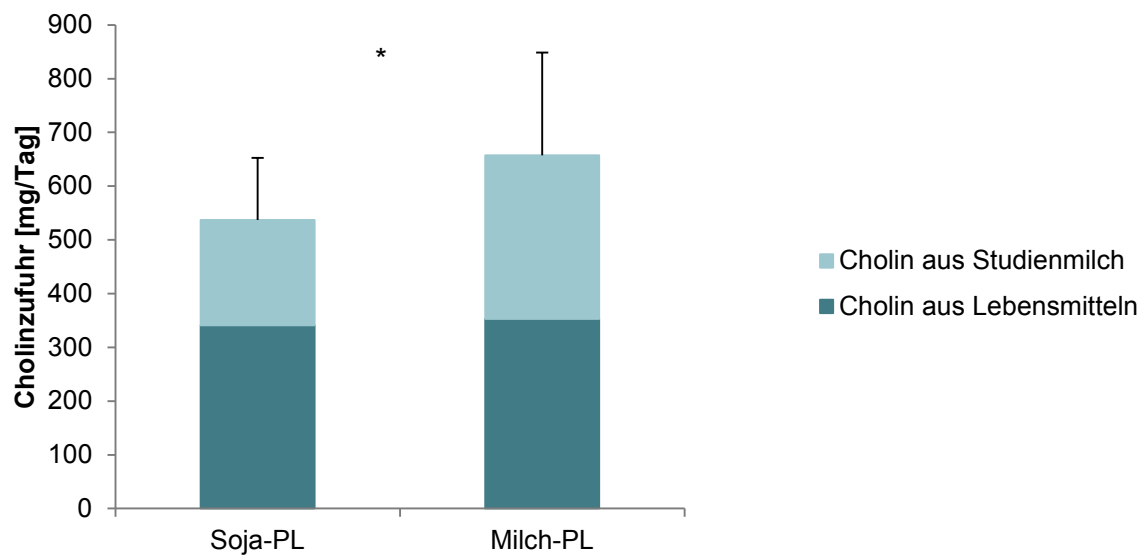


Abbildung 28: Tägliche Cholinzufuhr aus Lebensmitteln und Studienmilch während der Humanstudie 2.

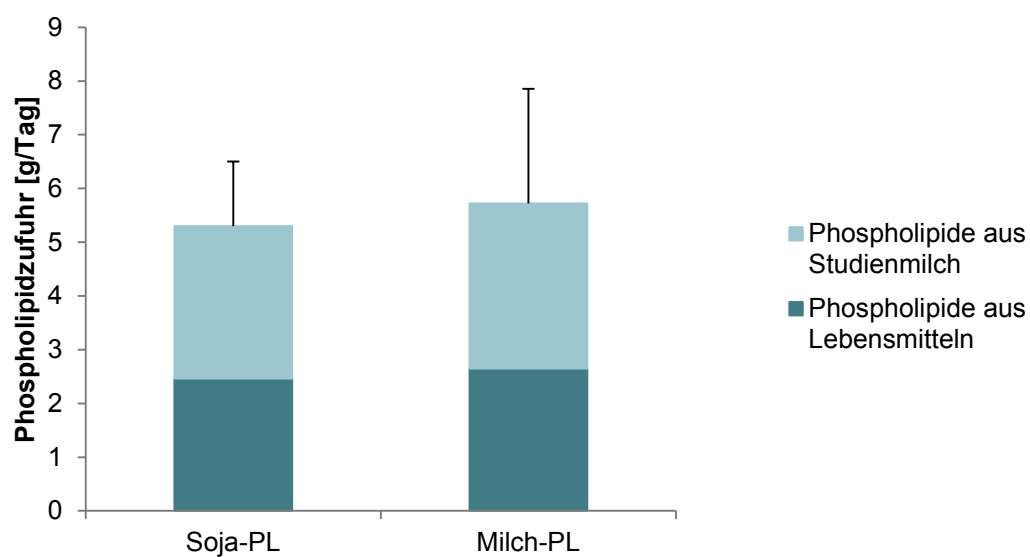


Abbildung 29: Tägliche Phospholipidzufuhr aus Lebensmitteln und Studienmilch während der Humanstudie 2.

## 5 Diskussion

HKE gelten weltweit als Haupttodesursache, ein bedeutender Risikofaktor dafür sind Lipidstoffwechselstörungen. PL können die intestinale C-Resorption hemmen und den Lipidstoffwechsel beeinflussen. Dabei ist die Wirkung sowohl von der PL-Klasse als auch von dem Sättigungsgrad und der Länge der gebundenen FS abhängig. Über die Wirkung von Milch-PL, die gekennzeichnet sind durch einen hohen Sättigungsgrad der FS, gibt es bisher nur wenige Untersuchungen. Am Max Rubner-Institut wurden deshalb zwei humane Interventionsstudien durchgeführt, die die Wirkung von Milch-PL im Vergleich zu Milch-TG mit ähnlichem FS-Muster bzw. im Vergleich zu Soja-PL untersuchte. In der Humanstudie 1 bekamen 62 übergewichtige Männer über einen Zeitraum von acht Wochen täglich 200 ml Milch, die entweder mit 2 g Milch-PL oder mit 2 g TG mit ähnlichem FS-Muster angereichert wurde. In der siebenwöchigen Humanstudie 2 tranken 57 Probanden täglich 250 ml Milch, die entweder mit 3 g Milch-PL oder mit 2,8 g Soja-PL angereichert wurde. Die Kombination dieser beiden Humanstudien erlaubt Aussagen darüber zu treffen, inwieweit mögliche Effekte auftreten und sich durch die gebundene Kopfgruppe oder die gebundenen FS der PL erklären lassen und ob sich die Wirkung von Milch-PL oder Soja-PL auf den Lipidstoffwechsel und weitere HKE-Parameter unterscheidet.

### 5.1 Auswahl des Studiendesigns

In beiden Studien wurde ein randomisiertes, kontrolliertes und doppelblindes Studiendesign gewählt, das den „Goldstandard“ für humane Interventionsstudien darstellt (Schulz *et al.* 2010). Die Humanstudien wurden im Paralleldesign durchgeführt, um mögliche *Carry-Over*-Effekte, die bei *Cross-Over*-Studien hätten auftreten können, zu vermeiden (Schulgen und Schumacher 2008). Die Gruppeneinteilung durch Randomisierung ergab in den untersuchten demografischen und klinischen Basisparametern keine signifikanten Unterschiede, deshalb konnte eine verzerrungsfreie Schätzung der Interventionseffekte bei der Auswertung der Studien gewährleistet werden (Schulgen und Schumacher 2008).

Die Power-Berechnung vor Studienbeginn ergab eine Teilnehmeranzahl von 30 Probanden pro Interventionsgruppe, die in der Humanstudie 1 erreicht wurde. In der Humanstudie 2 wurde die gewünschte Probandenzahl knapp unterschritten ( $n = 28$  bzw.

n = 29). Die beobachteten Effekte lassen den Schluss zu, dass auch bei Erreichen der Teilnehmeranzahl keine signifikanten Interventionseffekte aufgetreten wären.

Für die Humanstudien wurde als Trägerlebensmittel Milch ausgewählt, die mit PL bzw. TG mit ähnlichem Fettsäurenmuster angereichert wurde. Die Studienmilch konnte bei den Studienteilnehmern die übliche Trinkmilch ersetzen, sie konnte damit in die gewöhnliche Ernährung integriert werden. So sollte gewährleistet werden, dass die Probanden die Ernährungsgewohnheiten während der Studie beibehalten konnten. Allerdings war durch die Wahl des Trägerlebensmittels Milch die tägliche Gabe der PL limitiert, weil das PL-Pulver aus sensorischen Gründen nicht zu hoch konzentriert eingesetzt werden konnte, und in dem Milch-PL-Pulver nur etwa 20 % PL enthalten waren. Daneben durfte die Menge der Studienmilch nicht zu hoch sein, da Milch per se einen Einfluss auf verschiedene Parameter haben könnte (Huth und Park 2012, Givens 2012) und zusätzlich eine Veränderung der Ernährungsgewohnheiten erfolgt wäre. 3 g Milch-PL in 250 ml Milch war die maximal vertretbare PL- und Milch-Menge. Mit 2 bzw. 3 g PL wurde die tägliche PL-Zufuhr fast bzw. mehr als verdoppelt (s. Abschnitt 4.1.4 und 4.2.5). In vorherigen kontrollierten Humanstudien anderer Arbeitsgruppen wurden PL-Mengen zwischen 500 mg (Soja-Lecithin) (Mourad *et al.* 2010) und 20 g (Soja-Lecithin) (Oosthuizen *et al.* 1998) eingesetzt. In diesen Studien ist kein Zusammenhang zwischen der verabreichten PL-Menge und den Biomarkern erkennbar.

Wichtig war, dass die Probanden die Studienmilch während einer fetthaltigen Mahlzeit verzehrten, da die Arbeit von Burgess *et al.* (2005) gezeigt hat, dass ein Anstieg von HDL-C nur bei der Gabe von PL zusammen mit einer Mahlzeit, dort mit einem Frühstück, vorhanden war. Es ist davon auszugehen, dass diese Effekte auch zu einer anderen Tageszeit oder Mahlzeit sichtbar geworden wären. Ob die Probanden diese Vorgabe eingehalten haben, konnte jedoch nicht überprüft werden.

Andere Arbeitsgruppen wählten in ihren kontrollierten Humanstudien Interventionszeiträume bei unterschiedlichen Dosierungen zwischen 2 und 8 Wochen (O'Brien und Andrews 1993, Oosthuizen *et al.* 1998, Burgess *et al.* 2005, Ohlsson *et al.* 2009, Mourad *et al.* 2010, Snel *et al.* 2010). Dabei besteht kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen der Dauer der Studien und den beobachteten Effekten. Lediglich die Studie von Oosthuizen *et al.* (1998) beobachtete nach zwei Wochen erhöhte Lp(a)-Spiegel, die nach vier Wochen wieder beim Ausgangswert lagen. Für die Humanstudie 1 und 2 wurde eine Dauer von 8 bzw. 7 Wochen gewählt, um sicher zu gehen, dass keine transienten Effekte gemessen werden und die Zeit ausreichend ist, bis sich ein neues Gleichgewicht im Cholesterinstoffwechsel einstellt. Zusätzlich wird mit

dieser Studiendauer die Vergleichbarkeit zu vorangegangenen Humanstudien gewährleistet.

Durch die gewählten Ein- und Ausschlusskriterien konnten relativ homogene Probandenkollektive erreicht werden. In die Humanstudien 1 und 2 wurden nur Männer eingeschlossen, die einen BMI über 27 kg/m<sup>2</sup> hatten. Alle Probanden der Humanstudie 1 hatten einen Bauchumfang über dem Grenzwert (94 cm) und somit mindestens einen Risikofaktor für HKE. Von den insgesamt 63 Teilnehmern hatten 53 mindestens einen weiteren Risikofaktor für HKE, also Gesamt-C > 200 mg/dl, LDL-C > 150 mg/dl, HDL-C < 80 mg/dl oder Bluthochdruck > 140/80 mmHg (z.T. Medikation mit Blutdrucksenkern). In der Humanstudie 2 hatten alle bis auf einen Probanden einen erhöhten Bauchumfang und alle bis auf 12 mindestens einen weiteren Risikofaktor für HKE. Auch frühere Studien wurden mit Probanden mit Metabolischem Syndrom oder Lipidstoffwechselstörungen durchgeführt (Oosthuizen *et al.* 1998, Mourad *et al.* 2010, Snel *et al.* 2010), zwei davon nur mit Männern (Oosthuizen *et al.* 1998, Snel *et al.* 2010). In andere Studien wurden gesunde Männer (O'Brien und Andrews 1993, Ohlsson *et al.* 2010a) bzw. Männer und Frauen (Burgess *et al.* 2005, Ohlsson *et al.* 2009) eingeschlossen.

Wie der kritische Review von Knuiman *et al.* (1989) zeigt, ist die Auswahl einer geeigneten Kontrolle bei Untersuchungen zur Wirkung von PL von zentraler Bedeutung. PL können aufgrund der Kopfgruppe (Cholin) eine Wirkung haben, aber auch aufgrund der gebundenen Fettsäuren. Für die Unterscheidung zwischen Fettsäureneffekt und PL-Effekt wurden in der Humanstudie 1 als Kontrolle TG eingesetzt, die ein ähnliches Fettsäurenmuster aufweisen wie die Milch-PL. In der Humanstudie 2 wurde anschließend die Wirkung der Milch-PL gegen Soja-PL kontrolliert. Die These war, dass Milch-PL aufgrund des Gehalts an SM und dem höheren Anteil an gesättigten Fettsäuren die C-Resorption stärker hemmen können und die Blutlipidparameter günstiger beeinflussen können als Soja-PL. Bei der Interpretation der Humanstudie 2 sind daher die Interventionseffekte (Zeit x Intervention) von größter Bedeutung. Zeiteffekte sind schwierig zu interpretieren, da sie zum einen PL-Effekte und zum anderen Studieneffekte darstellen können. Ein Vergleich mit den Effekten in der Humanstudie 1 ist bei der Interpretation dieser Zeiteffekte hilfreich. Grundsätzlich wäre eine vierarmige Interventionsstudie aussagekräftiger, in der die Wirkung der Milch-PL mit der Wirkung der Soja-PL und den entsprechenden TG verglichen worden wäre. Dieses Design würde

aber eine doppelte Probandenanzahl bedeuten, und wäre im Rahmen dieses Projektes nicht durchführbar gewesen.

## 5.2 Ernährungsprotokolle

In beiden Humanstudien wurden von den Probanden Ernährungsprotokolle über einen Zeitraum von vier aufeinander folgenden Tagen während und außerhalb der Studienzeiträume geführt. Die Ernährungsprotokolle sollten mögliche Unterschiede in dem Lebensmittelverzehr zwischen den Gruppen identifizieren und es sollte eine mögliche Beeinflussung des Lebensmittelverzehrs durch die Studie erfasst werden. Weiterhin sollte durch die Ernährungsprotokolle kontrolliert werden, ob beobachtete Effekte auf Änderungen des Lebensmittelverzehrs während der Studie zurückzuführen sind.

Die Interventionsgruppen ernährten sich während der Humanstudie 1 gleich. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Ernährung während der Studie keinen Einfluss auf mögliche Interventionseffekte ausübte. Wie ein Vergleich der Ernährungsprotokolle mit Daten aus der NVS II zeigte, haben sich die Probanden der Humanstudien 1 ihrem Alter entsprechend normal ernährt. Dieser Vergleich spricht dafür, dass die Probanden das Ernährungsprotokoll gewissenhaft geführt haben und im Mittel kein *Underreporting* bzw. *Undereating* stattgefunden hat.

In der Humanstudie 2 unterschieden sich die beiden Interventionsgruppen signifikant in der Energiezufuhr während der Studie, wobei der Unterschied etwa 230 kcal betrug und auf eine höhere Kohlenhydratzufuhr in der Soja-PL-Gruppe als in der Milch-PL-Gruppe zurückzuführen ist. Da die Ernährungsweise aber die anthropometrischen Parameter nicht beeinflusste, sollten weitere Parameter durch diese Unterschiede in der Ernährungsweise nicht berührt werden. Ein Vergleich mit der NVS II Referenzgruppe spricht auch in dieser Studie dafür, dass die Probanden gewissenhaft ihren Lebensmittelverzehr protokolliert haben und dass *Underreporting* oder *Undereating* ausgeschlossen werden kann.

In der Humanstudie 1 und 2 wurde die tägliche PL-Zufuhr aus Lebensmitteln auf etwa 2,5 g pro Tag berechnet. Diese Menge stimmt mit der in der Literatur geschätzten Zufuhr von 2 bis 8 g pro Tag überein (Cohn *et al.* 2010b) und zeigt, dass die Berechnung der PL-Zufuhr realistisch war. In der Humanstudie 1 wurde durch Anreicherung der PL-Milch die tägliche Zufuhr deutlich erhöht, in der Humanstudie 2 mehr als verdoppelt.



In vorhergehenden Studien wurde die tägliche Cholinzufuhr bei Männern auf 313 mg pro Tag (Cho *et al.* 2006) bzw. 332 mg pro Tag (Bidulescu *et al.* 2007) geschätzt. Die Zufuhrempfehlung für Männer liegt in den USA bei 550 mg pro Tag (American Institute of Medicine 2000). In den Humanstudien 1 und 2 wurde berechnet, dass etwa 350 mg Cholin pro Tag über Lebensmittel aufgenommen wurden. Diese Berechnungen stimmen mit den Literaturwerten überein und können deshalb als exakt eingeschätzt werden. Durch den Verzehr der angereicherten PL-Milch wurde die tägliche Zufuhr von Cholin während des Studienzeitraums deutlich erhöht, wodurch die Zufuhrempfehlung für Cholin zum Teil erreicht wurde.

## 5.3 Interventionseffekte

### 5.3.1 Einfluss der Phospholipide auf anthropometrische Parameter

In der Humanstudie 1 wurden die anthropometrischen Parameter Körpergewicht, BMI und Bauchumfang in der Milch-PL-Gruppe leicht, aber signifikant gesenkt. Die Senkung des Bauchumfangs war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant. Da sich die Energiezufuhr während der Humanstudie 1 in beiden Gruppen nicht signifikant unterschied und keine Unterschiede in der Energiezufuhr während und außerhalb der Studie gezeigt wurden, sind diese minimalen Effekte nicht auf die unterschiedliche Energiezufuhr in beiden Gruppen zurückzuführen. Die Senkung des Bauchumfangs kann auf die Wirkung der Milch-PL zurückzuführen sein, aber auch Artefakte, Studieneffekte oder Zeiteffekte darstellen, die in der Milch-PL-Gruppe stärker ausgeprägt waren als in der Kontrollgruppe. In der Humanstudie 2 sind keine signifikanten Interventionseffekte auf die anthropometrischen Parameter beobachtet worden. In dieser Studie wurde lediglich das Körperfett in der Milch-PL-Gruppe, aber nicht in der Soja-PL-Gruppe gesenkt, wobei kein signifikanter Interventionseffekt vorlag. Snel *et al.* (2010) beobachteten keine Interventionseffekte auf die anthropometrischen Parameter. Bei Oosthuizen *et al.* (1998) zeigte sich keine Veränderung des Gewichts und BMIs in der Lecithingruppe und Yoghurtgruppe, jedoch eine Zunahme des Gewichts und BMIs in der Kontrollgruppe mit Öl. Allerdings wurde kein direkter statistischer Vergleich zwischen den Gruppen durchgeführt, die Gruppengröße war mit je sieben Personen relativ klein und es wurde keine Ernährungserhebung als Kontrolle durchgeführt.

Die anthropometrischen Parameter wurden als Kontrollparameter genutzt. Es ist bekannt, dass eine Gewichtsabnahme die Lipidparameter sowie weitere Parameter positiv beeinflussen kann (Richard *et al.* 2012). Da sich die anthropometrischen Parameter, wenngleich z.T. signifikant, nur sehr gering veränderten, wurde auf eine Adjustierung bei der statistischen Auswertung der weiteren Parameter verzichtet.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Wirkung der Milch- und Soja-PL in den Humanstudien 1 und 2 auf Bauchumfang und Körperfett nicht einheitlich war und eine allgemeingültige Aussage über die Wirkung von PL auf anthropometrische Parameter nicht getroffen werden kann.

### 5.3.2 Einfluss der Phospholipide auf Blutdruck und Pulsfrequenz

In der Humanstudie 1 wurde ein signifikanter Interventionseffekt auf den Puls beobachtet. Bei dem Interventionseffekt in Humanstudie 1 handelte es sich um nur sehr geringe Veränderungen, indem der Puls nach der Intervention in der Kontrollgruppe im Durchschnitt 3 Schläge pro Minute niedriger und in der Milch-PL-Gruppe etwa 1 Schlag pro Minute höher war als vor der Studie. Dieser Interventionseffekt wurde durch die Humanstudie 2 nicht bestätigt, hier wurden keine signifikanten Veränderungen beobachtet. Die Pulsfrequenz wird als Begleitparameter bei der Blutdruckmessung gemessen und gilt nicht als eigenständiger Risikoparameter für HKE.

Auf den systolischen und diastolischen Blutdruck wurde weder in der Humanstudie 1 noch in der Humanstudie 2 ein signifikanter Interventionseffekt beobachtet. Lediglich in der Milch-PL-Gruppe der Humanstudie 1 wurde nach der Intervention ein um 4 mmHG niedrigerer systolischer Blutdruck gemessen. Bisher liegen keine Studien vor, die einen Zusammenhang zwischen der Zufuhr von PL und Pulsfrequenz bzw. Blutdruck zeigen, auch in der Studie von Snel *et al.* (2010) wurde kein Einfluss der PL auf den Blutdruck und Pulsfrequenz beobachtet.

Die vorliegenden Ergebnisse aus diesen Humanstudien zeigen, dass PL die Pulsfrequenz nicht verändern. Auch der Blutdruck wurde durch die Gabe von PL nicht oder nur geringfügig verringert. Eine medizinische Relevanz für eine Veränderung des HKE-Risikos auf Basis dieser Ergebnisse kann nicht geschlussfolgert werden.

### 5.3.3 Einfluss der Phospholipide auf den Lipidstoffwechsel

Die Primärparameter der Humanstudien 1 und 2 waren die Lipidstoffwechsellparameter HDL-C, LDL-C, Gesamt-C und HDL-C/Gesamt-C. Dabei ist das Verhältnis HDL-C/Gesamt-C der wichtigste Primärparameter, da dieses den besten Prädiktor für das Risiko von HKE darstellt (Lewington *et al.* 2007).

Für verschiedene PL wie SM und PC konnte im Tierversuch bereits gezeigt werden, dass sie die intestinale C-Resorption dosisabhängig hemmen können (Nyberg *et al.* 2000, Eckhardt *et al.* 2002, Noh und Koo 2003). Die Hemmung der C-Resorption ist dabei abhängig von der PL-Quelle. Für Milch-SM wurde eine stärkere Hemmung gezeigt als für Ei-SM (Noh und Koo 2004), was auf einen Einfluss der FS schließen lässt. Ein höherer Sättigungsgrad der FS sowie längere FS hemmen wahrscheinlich effektiver (Eckhardt *et al.* 2002, Carr und Jesch 2006). In weiteren Studien konnte schon gezeigt werden, dass PL einen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel ausüben, wie in Abschnitt 1.3.1 beschrieben. In der Humanstudie 1 sollte daher die Wirkung der Milch-PL untersucht werden, die mit TG mit ähnlichem Sättigungsgrad der FS kontrolliert wurde. In der Humanstudie 2 wurde geprüft, ob die Gabe von Milch-PL einen stärkeren Einfluss auf den Lipidstoffwechsel ausübt als Soja-PL.

Da die vorhergehenden Studien zum Teil mit erheblich größeren Mengen an PL (O'Brien und Andrews 1993, Oosthuizen *et al.* 1998) bzw. mit Soja-PL und Ei-PL (O'Brien und Andrews 1993, Oosthuizen *et al.* 1998, Burgess *et al.* 2005, Mourad *et al.* 2010, Snel *et al.* 2010) durchgeführt wurden, lassen sich die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen am besten mit den Ergebnisse von Ohlsson *et al.* (2009) vergleichen, die ebenfalls Milch-PL eingesetzt haben. Trotzdem werden im Folgenden die Ergebnisse der Humanstudie 1 und 2 auch auf die anderen Studien bezogen.

**HDL-C** wurde weder in der Humanstudie 1 noch in der Humanstudie 2 verändert. Im Gegensatz dazu wurde bei Burgess *et al.* (2005) ein Einfluss auf den HDL-Spiegel durch die Gabe von PI beobachtet. In dieser Arbeit bewirkten 5,6 g PI pro Tag einen Anstieg des HDL-C um 4 bis 18 %, bei einer geringeren Gabe von 2,8 g pro Tag war keine Effekt innerhalb der Interventionsgruppen erkennbar. In Humanstudien, in denen die tägliche PL-Gabe bis zu 1 g betrug, wurde ebenfalls keine Erhöhung des HDL-C erreicht (Mourad *et al.* 2010, Snel *et al.* 2010). Dies deutet darauf hin, dass die Gabe der PL in den vorliegenden Humanstudien möglicherweise zu gering war, um das HDL-C zu erhöhen. Allerdings wurde auch in der Studie von Oosthuizen *et al.* (1998), in der täglich 20 g Sojalecithin gegeben wurden, kein Anstieg beobachtet.

Die Gabe von Milch-PL bzw. Soja-PL bewirkte keine Änderung des **LDL-C** in den Humanstudien 1 und 2. In vorhergehenden Studien wurde dieser Parameter durch die Intervention zum Teil gesenkt (Mourad *et al.* 2010, Snel *et al.* 2010) oder keine Effekte beobachtet (Oosthuizen *et al.* 1998, Burgess *et al.* 2005). In der Studie von Snel *et al.* (2010) wurde das LDL-C um etwa 9 % gesenkt, bei Mourad *et al.* (2010) nach vier Wochen um 43 % und nach acht Wochen um 56 % im Vergleich zur Ausgangskonzentration.

Auf **Gesamt-C** zeigte die Intervention mit 2 g Milch-PL in der Humanstudie 1 keine Wirkung, wohingegen es in der Humanstudie 2 in der Milch-PL-Gruppe, nicht jedoch in der Soja-PL-Gruppe um etwa 3 % signifikant abnahm. Von einer Abnahme des Gesamt-C um etwa 5 % (Snel *et al.* 2010) bzw. etwa 40 % (Mourad *et al.* 2010) wurde in vorhergehenden Studien berichtet. In anderen Studien wurde Gesamt-C nicht verringert (O'Brien und Andrews 1993, Oosthuizen *et al.* 1998, Burgess *et al.* 2005). Das Verhältnis von Gesamt-C/HDL-C wurde ausschließlich in der Studie von Snel *et al.* (2010) untersucht, dort wurde das Verhältnis um etwa 7 % gesenkt. Da in den Humanstudien 1 und 2 Gesamt-C und HDL-C nicht verändert wurden, bewirkte die Gabe von 2 bis 3 g Milch- und Soja-PL folglich keinen Effekt auf **Gesamt-C/HDL-C**. In der Untersuchung von Oosthuizen *et al.* (1998) wurde kein signifikanter Interventionseffekt auf das Verhältnis LDL/HDL beobachtet.

Auch in der Studie von Ohlsson *et al.* (2009) wurden keine signifikanten Interventionseffekte auf Gesamt-C, HDL-C, LDL-C, TG und Apo B durch die Gabe von täglich 2,8 g Milch-PL über vier Wochen im Vergleich zur Kontrolle mit 2,7 g Ei-PL bewirkt. Die Studie von Ohlsson *et al.* (2009) zeigte aber einen nicht signifikanten Anstieg der Plasmalipide Gesamt-C, LDL-C und TG in der Ei-PL-Gruppe, der in der Milch-PL-Gruppe nicht vorhanden war. Allerdings waren die Ausgangswerte von Gesamt-C, LDL-C und TG in der Ei-PL-Gruppe niedriger als in der Milch-PL-Gruppe (nicht signifikant), sodass eine Interpretation dieses Trends schwierig ist. Die Arbeitsgruppe postulierte, dass die Milch-PL-Intervention einen Anstieg der Lipide verhinderte, der möglicherweise durch eine erhöhte Zufuhr an Cholesterin und gesättigten FS aus den Studiengetränken resultierte. In den Humanstudien 1 und 2 wurde kein vergleichbarer Effekt auf diese Parameter festgestellt.

In den Humanstudien 1 und 2 bewirkte die Gabe von Milch- bzw. Soja-PL keine Änderung der **TG-Konzentration**. Auch vorhergehende Studien konnten keinen Einfluss der PL auf den TG-Spiegel feststellen, daher stehen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien (O'Brien und Andrews 1993,

Oosthuizen *et al.* 1998, Burgess *et al.* 2005, Ohlsson *et al.* 2009, Snel *et al.* 2010, Mourad *et al.* 2010). Einen Anstieg der Plasma-PL durch die Gabe von PL haben O'Brien und Andrews (1993) gezeigt. In den vorliegenden Studien konnte dieser Effekt jedoch nicht bestätigt werden. Allerdings war in der Studie von O'Brien und Andrews (1993) die verabreichte PL-Dosis mit 15 g pro Tag Soja-Lecithin deutlich höher. In weiteren Studien hingegen wurde dieser Parameter nicht gemessen.

Daneben wurde der Einfluss der PL auf das Apolipoproteinprofil und Lp(a) untersucht. Weder in der Humanstudie 1 noch in der Humanstudie 2 hatte die Intervention mit PL einen Effekt auf **Apo A1**. Dieses Ergebnis bestätigt vorhergehende Untersuchungen, die ebenfalls keinen Einfluss der PL auf Apo A1 gezeigt haben (O'Brien und Andrews 1993, Oosthuizen *et al.* 1998, Burgess *et al.* 2005). Allerdings wurde ein Anstieg von Apo A1 im Plasma in den Studien von Polichetti *et al.* (1998) und Burgess *et al.* (2005) (nicht kontrolliert) gezeigt sowie in einer nichtkontrollierten Studie ein Anstieg von Apo A1 in HDL (Spann *et al.* 1987a) beobachtet. Dagegen wurde in der Studie von Ohlsson *et al.* (2009) eine signifikante Reduktion von Apo A1 in der Milch-PL-Gruppe, nicht aber in der Ei-PL-Gruppe gezeigt. Für mehrfach ungesättigte Fettsäuren wurde bereits eine Erhöhung des Apo A1 gezeigt (Spann *et al.* 1987b). Dies könnte den Anstieg des Apo A1 in den nichtkontrollierten Studien von Polichetti *et al.* (1998) und Burgess *et al.* (2005) erklären.

Die **Apo B**-Konzentrationen wurden weder durch die Intervention in Humanstudie 1 noch durch die Intervention in Humanstudie 2 signifikant verändert. In der Studie von Oosthuizen *et al.* (1998) waren die Apo B-Konzentrationen nach 2 Wochen erhöht, nach 4 Wochen aber wieder beim Ausgangswert. In einer *Cross-over*-Studie von Spann *et al.* (1987b) wurde Apo B in den LDL sowohl in der PL-Gruppe, als auch in der Kontrollgruppe durch Distelöl gesenkt. Weitere Studien zeigten ebenfalls wie in den vorliegenden Untersuchungen keinen Einfluss der PL auf die Apo B-Spiegel, jedoch war der Interventionszeitraum dieser Studien mit 6 (O'Brien und Andrews 1993) bzw. 4 Wochen (Ohlsson *et al.* 2009) länger als die von Oosthuizen *et al.* (1998). Möglicherweise handelt es sich bei dem Anstieg des Apo B um einen kurzfristigen Effekt, der langfristig nicht bestehen bleibt.

In der Humanstudie 1 war **Lp(a)** am Ende des Studienzeitraums in der Milch-PL-Gruppe um etwa 24 % signifikant erhöht, blieb in der Kontrollgruppe jedoch konstant. Im Gegensatz dazu waren in der Humanstudie 2 die Lp(a)-Spiegel fast unverändert. In einer Studie von Oosthuizen *et al.* (1998) waren nach zwei Wochen mit täglich 20 g Soja-PL

die Lp(a)-Spiegel bei Männern erhöht, lagen aber nach vier Wochen wieder beim Ausgangswert. Ohlsson *et al.* (2009) beobachteten, dass möglicherweise die Wirkung von Milch-PL geschlechtsabhängig ist, da Lp(a) bei Männern die Gabe von täglich 975 mg Milch-SL) eine Erhöhung der Spiegel um fast 10 %, bei Frauen hingegen eine Senkung um etwa 10 % bewirkte (jeweils nicht signifikant). Bei der Interpretation von weiteren Studien sollte daher berücksichtigt werden, ob es sich bei den StudienteilnehmerInnen um Frauen oder Männer handelt.

Vergleicht man die Ergebnisse der Studie von Ohlsson *et al.* (2009) mit den Ergebnissen aus den Humanstudie 1 und 2, so liegen keine homogenen Effekte der Milch-PL auf die Lipoproteine Lp(a) und Apo A1 und die Konzentration von Gesamt-C vor. Die beobachtete Senkung von Apo A1 gilt als atherogen, ebenso wie der Anstieg von Lp(a), wohingegen die Senkung von Gesamt-C positiv zu bewerten ist.

Zusammenfassend zeigen die Humanstudien 1 und 2 durch die Gabe von Milch-PL oder Soja-PL keine Verbesserung der Lipidparameter, die mit dem HKE-Risiko assoziiert sind.

#### 5.3.4 Einfluss der Phospholipide auf Diabetesparameter

Diabetes ist ein Hauptrisikoparameter für HKE und eine frühe Erkennung und Behandlung ist eine wichtige Säule der HKE-Prävention (WHO 2007, WHO 2010a). In der Humanstudie 1 wurde in der Kontrollgruppe der Glukosespiegel leicht, aber signifikant gesenkt, wohingegen keine Veränderung in der Milch-PL-Gruppe zu verzeichnen war. Insulin und HOMA-IR wurden wiederum nicht verändert. In der Humanstudie 2 wurde der Glukosespiegel in der Milch-PL-Gruppe, nicht aber in der Soja-PL-Gruppe gesenkt. Insulin und HOMA-IR wurden nicht verändert. In beiden Humanstudien waren keine signifikanten Interventionseffekte vorhanden. Snel *et al.* (2010) untersuchten die Wirkung von Soja-PL auf den Glukosestoffwechsel bei Männern mit Metabolischem Syndrom. Nach der Intervention war die basale Glukosekonzentration signifikant niedriger als in der Placebogruppe, auf weitere Glukosestoffwechselfparameter bewirkte die Intervention allerdings keinen Einfluss. In einer Tierstudie mit Zucker-Ratten wurde der Insulinspiegel durch SM und Glucosylceramid gesenkt, der Glukosespiegel aber blieb unbeeinflusst. Adiponektin, ein Hormon das die Insulinwirkung verstärkt, wurde nur durch Glucosylceramid signifikant erhöht (Yunoki *et al.* 2010). Auch in db/db-Mäusen und in adipösen Lrh-1<sup>ff</sup>-Mäusen bewirkte eine Fütterung (über 2 oder 3 Wochen) mit DLPC im Vergleich zur Kontrolle niedrigere Glukose- und Insulinspiegel im

Serum (Lee *et al.* 2011). In einer weiteren Studie an Zucker-Ratten wurde ein erniedrigter Insulinspiegel nach PI-Fütterung beobachtet, der aber nicht signifikant war. Dagegen war das Serum-Adiponektin in dieser Studie signifikant erhöht (Shirouchi *et al.* 2008).

Snel *et al.* (2010) untersuchten in ihrer Studie die Wirkung von Soja-PL auf den Glukosestoffwechsel, indem sie einen intravenösen Glukosetoleranztest nach der Intervention durchführten. Die Studie wurde mit Männern mit Metabolischem Syndrom durchgeführt, die einen HOMA-IR über 2,0 aufwiesen. Nach der Intervention war die basale Glukosekonzentration signifikant niedriger als in der Placebogruppe, auf weitere Stoffwechselfparameter hatte die Intervention allerdings keinen Einfluss. Snel *et al.* (2010) diskutierten, dass die verringerte basale Glukosekonzentration auf eine geringer intestinale Glukoseresorption und bzw. oder eine erniedrigte endogene Glukoseproduktion in der Leber zurückzuführen ist und bezogen sich auf Barrenetxe *et al.* (2006), die bereits gezeigt haben, dass die intestinale Glukoseresorption durch SM gehemmt wird.

In den Humanstudien 1 und 2 wurden als Glukosestoffwechselfparameter Glukose und Insulin gemessen, und daraus HOMA-IR berechnet. Weitere Parameter wie Adiponektin wurden nicht gemessen und es wurde auf die aufwändigen oralen Glukosetoleranztests zu Beginn und am Ende der Studie verzichtet. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus den Humanstudien 1 und 2 mit den dargestellten Tierstudien ist allerdings eingeschränkt, da es sich um Tiere handelt, die genetisch modifiziert waren und z.T. eine Hyperinsulinämie oder einen Diabetes aufwiesen. Ebenso wiesen die Probanden in der Humanstudie von Snel *et al.* 2010 einen HOMA-IR über 2,0 auf. Bei den Probanden der Humanstudien 1 und 2 lag kein gestörter Glukosestoffwechsel vor, da Interessenten mit einem manifestierten Diabetes mellitus von der Studie ausgeschlossen wurden. Es ist denkbar, dass die Wirkung von PL nur bei Personen mit Diabetes oder einem gestörten Glukosestoffwechsel besteht.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die in früheren Human- und Tierstudien gesehenen Effekte auf den Glukose- und Insulinspiegel im Rahmen dieser Humanstudien nicht bestätigt werden konnten.



### 5.3.5 Einfluss der Phospholipide auf Leberenzyme

Die Leberenzyme GGT, AST und ALT wurden in den Humanstudien 1 und 2 als Sicherheitsparameter gemessen und sind keine HKE-Risikoparameter, wobei jedoch die NAFLD mit Diabetes und Adipositas assoziiert ist (Hooper *et al.* 2011). In der Humanstudie 1 wurde ein signifikanter Interventionseffekt auf GGT beobachtet. GGT stieg in der Kontrollgruppe um etwa 18 % an, blieb aber in der Milch-PL-Gruppe weitestgehend konstant. ALT stieg in der Kontrollgruppe signifikant um 16 % an und blieb ebenfalls in der Milch-PL-Gruppe konstant. Das Enzym AST zeigte nach der Intervention mit Milch-PL, nicht jedoch mit der Kontrolle eine um 6 % verringerte Aktivität. Auch in der Humanstudie 2 zeigte sich bei der Aktivität der GGT ein signifikanter Interventionseffekt, in der Soja-PL-Gruppe stieg die Aktivität leicht an und nahm in der Milch-PL-Gruppe ab. Die beiden anderen Leberenzyme wurden durch die Interventionen in ihrer Aktivität allerdings nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse lassen auf einen möglichen protektiven Effekt der PL schließen und passen zu den Ergebnissen einer Studie von Nieuwenhuizen *et al.* (2007), in der die ALT-Aktivität in APOE\*3-Leiden Mäusen nach einer 5-wöchigen Interventionsstudie mit 1 % Phytosphingosin in einer typisch westlichen Ernährungsweise um 79 % vermindert wurde. In einer weiteren Studie von Shirouchi *et al.* (2008) wurde die AST- und ALT-Aktivität durch eine vierwöchige Fütterung mit 2 % Soja-PI und 5 % Sojaöl im Vergleich zu 7 % Sojaöl um 37 bzw. 47 % in Zucker-Ratten gesenkt. In weiteren Tierversuchen wurde durch Fütterung von PL Leberparameter positiv beeinflusst, indem niedrigere relative und absolute Lebergewichte und geringere Lipid-Einlagerungen in die Leber beobachtet wurden (Iwata *et al.* 1993, Wat *et al.* 2009, Yunoki *et al.* 2010). In einer Humanstudie bewirkte aber die Gabe von täglich 34 g PC (entsprach 2,6 g Cholin) keine Veränderung der Aktivität von ALT, AST und GGT im Vergleich zur Kontrolle (Olthof *et al.* 2005).

Ein Cholinmangel kann für die Entwicklung von (Fett-) Lebererkrankungen verantwortlich sein (Buchman *et al.* 1995). Beim Menschen konnten Zeisel *et al.* (1991) zeigen, dass eine cholindefiziente Diät (13 mg/Tag) im Vergleich zu einer Diät mit hohem Cholingehalt (700 mg/Tag) zu signifikant höheren ALT-Aktivitäten, nicht aber zu veränderten AST- und GGT-Aktivitäten führt. Eine Kohortenstudie mit NAFLD-Patienten konnte jedoch bei Männern keinen Zusammenhang zwischen der Cholinzufuhr und der Aktivität der Leberenzymen ALT und AST feststellen (Guerrero *et al.* 2012). Da die Probanden der Humanstudie 1 die empfohlene Cholinzufuhr (für die USA) über den Lebensmittelverzehr nicht erreicht haben, ist es denkbar, dass die Effekte auf die Leberenzyme auf die mit den Milch-PL zugeführte Cholinmenge zu erklären ist.



Für die Interpretation der Interventionseffekte in Humanstudie 1 und 2 gilt zu beachten, dass die Leberenzyme im Mittel innerhalb des Referenzbereichs anstiegen, und nur bei einigen Probanden außerhalb des Referenzbereichs lagen. Die untersuchten Leberenzyme sind unspezifische Parameter und eine allgemeingültige Aussage, ob Milch-PL auf chronische oder akute Erkrankungen einen Einfluss hatten, kann nicht getroffen werden.

Zusammenfassend geben die Ergebnisse aus den Humanstudien 1 und 2 Hinweise, dass PL eine positive Wirkung auf Leberenzyme haben könnten und dass diese Wirkung bei Milch-PL stärker ausgeprägt ist als bei Soja-PL.

#### 5.3.6 Einfluss der Phospholipide auf weitere Parameter

In der Humanstudie 2 wurde keine Wirkung der PL auf den Glutathionstatus beobachtet. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu einer Studie von Innis *et al.* (2007), in der die Gabe von täglich 2 g Soja-Lecithin den GSH-Status verbesserte. Allerdings gab es in dieser Studie keine Kontrollgruppe. Bei den Probanden handelte es sich um Kinder mit Zystischer Fibrose, die mit den Probanden der Humanstudie 1 und 2 nicht vergleichbar sind, da diese per se einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt sind und einen niedrigen GSH-Status haben (Innis und Davidson 2008). Wie die GSH-Konzentration zu Beginn der Humanstudie 2 zeigen, wiesen die Probanden einen normalen GSH-Status auf, sodass eine zusätzliche Wirkung von PL auf das Gesamt-GSH nicht zu erwarten war.

Weiterhin wurden die Inflamationsparameter IL-6, ICAM und Complement C3 in der Humanstudie 1 nicht beeinflusst. In der Humanstudie 2 wurden ICAM und CRP nicht beeinflusst, IL-6 stieg nur in der Milch-PL-Gruppe signifikant an. Wie eine epidemiologische Studie von Detopoulou (2008) zeigte, ist die Zufuhr von Cholin mit niedrigen Konzentrationen an CRP und IL-6 assoziiert. Eine Gabe von Cholin in Form von PL konnte in den Humanstudien 1 und 2 diese Inflamationsparameter aber nicht beeinflussen.

### 5.3.7 Einzelnukleotidpolymorphismus-Analyse des Genotyps 5-,10-Methylen-tetrahydrofolatreduktase C677T und Einfluss der Phospholipide auf den Homocysteinspiegel

Da eine höhere Zufuhr von Betain und Cholin mit niedrigeren Nüchtern-Homocysteinkonzentrationen assoziiert ist (Cho *et al.* 2006, Lee *et al.* 2010), wurde vermutet, dass die Gabe von Cholin-enthaltenden PL bei Probanden mit einer Hyperhomocysteinämie die Homocysteinkonzentration senken kann. Eine Humanstudie von Olthof *et al.* (2005) konnte bereits eine Senkung durch diese PL zeigen. In den Humanstudien 1 und 2 konnte aber die Gabe von PL den Homocysteinspiegel nicht beeinflussen. Im Unterschied zu der Studie von Olthof *et al.* (2005) wurden in den Humanstudien 1 und 2 viel geringere Mengen an PL (2 bzw. 3 g versus 34 g/Tag) und damit deutlich weniger Cholin eingesetzt (196 bzw. 303 mg versus 2600 mg/Tag). Möglicherweise reichte die in der Humanstudie 2 zur Verfügung gestellte Menge an Cholin für eine Senkung nicht aus. Daneben waren die Homocystein-Ausgangswerte in den Humanstudien 1 und 2 geringer (etwa 12-14  $\mu\text{mol/l}$ ) als die in der Studie von Olthof *et al.* (2005) (16-17  $\mu\text{mol/l}$ ). Es ist denkbar, dass die Wirkung von PL bzw. Cholin erst bei höheren Homocystein-Ausgangswerten zum Tragen kommt.

Da der Genotyp MTHFR C677T einen Einfluss auf den Homocysteinspiegel hat (Crider *et al.* 2011), wurde untersucht, ob Interventionseffekte bei unterschiedlichen Genotypen auftreten. Dazu wurde zuerst eine Genotypisierung durchgeführt. Die Verteilung der Genotypen im Kollektiv entsprach mit einer Allelfrequenz von C = 68 % und T = 32 % der in der Literatur beschriebenen Verteilung. Botto und Yang (2000) berechneten für Deutschland, dass die Allelfrequenz von T zwischen 20,3 und 30,8 % liegt. In anderen europäischen Ländern wurde eine Allelfrequenz von T zwischen 26,9 und 46,0 % ermittelt (Wilcken *et al.* 2003).

Auch in dieser Studie konnte sehr deutlich der Einfluss des Genotyps MTHFR C677T auf die Homocysteinkonzentration gezeigt werden. Bei doppelt so vielen Probanden aus der T-Allel-Gruppe lagen erhöhte Homocysteinspiegel, d.h. über 12  $\mu\text{mol/l}$ , vor als bei Probanden der C-Allel-Gruppe. Es war aber kein Einfluss der Intervention auf den Homocysteinspiegel, auch unter getrennter Betrachtung der Allelgruppen, erkennbar. Dies steht in Einklang mit der Studie von Yan *et al.* (2011), in der die Gabe von 550 mg im Vergleich zu 1100 mg Cholin pro Tag keinen unterschiedlichen Interventionseffekt bei den Genotypen 677CC und 677TT hatte.

Die Aussagekraft über die Wirkung von PL bei unterschiedlichen Genotypen in der Humanstudie 2 ist jedoch eingeschränkt. Zum einen wurden die Probanden nicht nach

Genotypen eingeschlossen, sodass es zu stark unterschiedlichen Gruppengrößen kam und lediglich zwei Probanden den Genotyp MTHFR 677TT hatten. Diese Probanden wurden daraufhin mit den Probanden des Genotyps MTHFR 677CT zusammengeschlossen. Zum anderen war die verabreichte Cholinmenge in der Milch-PL-Gruppe nur um etwa 110 mg pro Tag höher als in der Soja-PL-Gruppe. Sinnvoll wäre diese Untersuchung auch im Rahmen der Humanstudie 1 gewesen, dort wurden der Kontrollgruppe durch die Studienmilch nur sehr geringe Mengen an Cholin zur Verfügung gestellt. Die Genotypisierung war leider im Rahmen des Projekts nicht möglich. So kann abschließend nicht geklärt werden, ob der Genotyp MTHFR C677T in einem Probandenkollektiv mit höheren Homocysteinspiegeln sowie gleichen Gruppengrößen bei einer Intervention mit stark unterschiedlichen Cholinmengen einen Einfluss auf den Homocysteinspiegel hätte.

#### 5.4 Abschließende Betrachtung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Gabe von 2 g Milch-PL im Vergleich zu einer Kontrollmilch mit Milch-TG mit ähnlichem FS-Muster keine Wirkung auf die untersuchten Parameter des Lipidstoffwechsels (HDL-C, LDL-C, Gesamt-C, Gesamt-C/HDL-C, Apo A1, Apo B, Lp(a) und PL) hat. Des Weiteren erzielte die Gabe von 3 g Milch-PL keine unterschiedlichen Effekte auf diese Lipidparameter im Vergleich zur Gabe von 2,8 g Soja-PL. Damit wird deutlich, dass Milch-PL keine Wirkung unabhängig von den gebundenen Fettsäuren haben, und dass Milch-PL aufgrund ihres Gehalts an SM und den gesättigten FS keine stärkere Wirkung auf das Lipidprofil ausüben als Soja-PL. Im Gegensatz zu einigen früheren Studien (O'Brien und Andrews 1993, Ristic Medic *et al.* 2003, Ristic Medic *et al.* 2006, Mourad *et al.* 2010) entsprachen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Humanstudien 1 und 2 den Anforderungen, die an humane Interventionsstudien gestellt werden. Dazu gehören Verblindung und Randomisierung sowie geeignete Fettsäurenkontrollen und Gruppengrößen (Knuiman *et al.* 1989, Schulz *et al.* 2010). Dadurch haben die Humanstudien 1 und 2 eine sehr hohe Aussagekraft. So kann geschlussfolgert werden, dass weder Milch-PL noch Soja-PL eine Wirkung auf den Lipidstoffwechsel bei Männern im Alter zwischen 50 und 76 mit Risikofaktoren für HKE haben. Die Wirkung von Soja-Lecithin, die in vorangegangenen Studien gezeigt wurde, ist wahrscheinlich nicht auf die darin enthaltenen PL zurückzuführen, sondern möglicherweise auf Begleitstoffe wie PUFAs und Pflanzensterole (LeBlanc *et al.* 1998, Chen *et al.* 2008, Snel *et al.* 2010). Sie können aber auch sogenannte „Design-Artefakte“ darstellen (Knuiman *et al.* 1989, Polichetti *et al.* 1998). Insofern haben die

Humanstudien 1 und 2 für Klarheit bezüglich der Wirkung von Milch-PL auf Lipidparameter gesorgt. Für die Planung weiterer humaner Interventionsstudien sollte daher unbedingt ein gutes Studiendesign gewählt werden.

Über die Wirkung von PL bei Frauen hingegen kann keine Aussage getroffen werden. Geschlechtsspezifische Wirkungen der PL wurden bisher noch nicht untersucht, scheinen aber möglich (Ohlsson *et al.* 2009). In weiteren Studien sollten daher Frauen eingeschlossen werden und eine geschlechtsspezifische Auswertung stattfinden.

Die Interventionseffekte auf die Aktivität von GGT in den Humanstudien 1 und 2 zeigen einen möglichen protektiven Effekt der PL auf Lebererkrankungen, der bei Milch-PL stärker ausgeprägt ist als bei Soja-PL. Da NAFLD eine Erkrankung ist, bei der mit einer Zunahme der Prävalenz zu rechnen ist, und für die es noch keine Therapiemöglichkeiten gibt, sollte dieser Ansatz weiter verfolgt werden. Dabei sollte in Studien eine äquivalente Cholinmenge als Kontrolle eingesetzt werden.

Eine zweite mögliche Wirkung der PL steht im Zusammenhang mit Diabetes, die in den Humanstudien 1 und 2 jedoch so nicht bestätigt wurden. Die Pilotstudie von Lee *et al.* mit prädiabetischen Patienten wird zeigen, ob weitere Untersuchungen dazu sinnvoll sind, oder ob die Wirkungen nur im Tier relevant sind (Anon 2011). Hier sind die unterschiedlichen Wirkungen von gebundenen Fettsäuren zu untersuchen.

## 6 Zusammenfassung

Unter Herz-Kreislauf-Erkrankungen (HKE) werden Erkrankungen verstanden, die das Herz und den Blutkreislauf betreffen. An HKE sterben weltweit die meisten Menschen. Lipidstoffwechselstörungen gehören zu den Hauptrisikofaktoren für HKE. Dazu gehören erhöhte Konzentrationen an *low density lipoprotein* (LDL) Cholesterin (C) und Gesamt-C-Konzentration im Plasma sowie erniedrigte *high density lipoprotein* (HDL)-C-Spiegel. Das Verhältnis von Gesamt-C zu HDL-C gilt als bester Prädiktor für verschiedene Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems wie ischämische Herzerkrankungen.

Phospholipide (PL) sind phosphathaltige, komplexe, polare Lipide, die ubiquitär in biologischen Membranen als Hauptbestandteil zu finden sind. Sie sind nicht nur unerlässlich für die intestinale Triglycerid- und C-Resorption im Menschen, sondern können, in exzessiven Dosen gegeben, die C-Resorption ebenso hemmen. PL können auch Signalfunktionen besitzen. Es gibt Untersuchungen die zeigen, dass PL mit einem hohen Anteil an Sphingomyelin (SM) und einem hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren (FS) die C-Resorption aus dem Darm stärker hemmen können als PL, die kein SM enthalten und einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigte FS haben. Zusätzlich können PL mit gesättigten FS einen stärkeren Einfluss auf den intermediären Lipidstoffwechsel ausüben, indem sie einen stärkeren Anstieg an Apo A1 und HDL als mehrfach ungesättigte FS bewirken. Milch-PL haben einen hohen Anteil an SM (fast 20 %) und einen hohen Anteil an ungesättigten FS, wohingegen Soja-PL kein SM enthalten und einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten FS aufweisen. Bisher wurde erst eine Langzeitstudie zur Wirkung von Milch-PL, die mit Ei-PL verglichen wurde, durchgeführt. Deshalb sind weitere Studien zur Wirkung von Milch-PL im Vergleich zu Milch-TG mit ähnlichem FS-Muster und Soja-PL nötig, um diese Hypothesen zu prüfen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung der Milch-PL auf den Lipidstoffwechsel und weitere Risikofaktoren für HKE zu untersuchen. Dazu wurden zwei humane Interventionsstudien im parallelen, doppelblinden, randomisierten und kontrollierten Design durchgeführt. In der Humanstudie 1 bekamen 62 übergewichtige und adipöse Männer (*Body Mass Index*  $30,8 \pm 2,4 \text{ kg/m}^2$ ,  $62,5 \pm 6,4$  Jahre alt) über einen Zeitraum von acht Wochen täglich entweder 2 g Milch-PL oder 2 g Milch-TG mit ähnlichem Fettsäurenmuster in 200 ml Milch. Zu Beginn und am Ende des Interventionszeitraums wurden anthropometrische und physische Untersuchungen durchgeführt und Blutparameter des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels sowie Inflammationsmarker bestimmt. Als Primärparameter galt das Verhältnis von Gesamt-C/HDL-C.

In Humanstudie 1 bewirkte die Intervention mit täglich 2 g Milch-PL im Vergleich zur Kontrolle keine Senkung von atherogenen Plasmalipiden (Gesamt-C, LDL-C, TG, Apo B, Lp(a)) und keine Erhöhung von schützenden Plasmalipiden (Apo A1, HDL-C). In der Kontrollgruppe wurde der Glukosespiegel leicht, aber signifikant gesenkt, wohingegen keine Veränderung in der Milch-PL-Gruppe zu verzeichnen war. Insulin und HOMA-IR wurden nicht verändert. Daneben wurde ein signifikanter Interventionseffekt auf die Aktivität von  $\gamma$ -Glutamyltransferase (GGT) beobachtet, diese stieg in der Kontrollgruppe um etwa 18 % an, blieb aber in der Milch-PL-Gruppe weitestgehend konstant. Die Aktivität der Alanin-Aminotransferase stieg in der Kontrollgruppe signifikant um 16 % an und blieb ebenfalls in der Milch-PL-Gruppe konstant. Das Enzym Aspartat-Aminotransferase lag nach der Intervention mit Milch-PL in seiner Aktivität um 6 % verringert vor, jedoch nicht in der Kontroll-Gruppe.

In der Humanstudie 2 wurde die Wirkung der Milch-PL mit der Wirkung der Soja-PL verglichen. Dazu tranken 57 Männer über einen Zeitraum von sieben Wochen täglich 250 ml Milch, die entweder mit 3 g Milch-PL oder mit 2,8 g Soja-PL angereichert wurde. Auch in dieser Studie fanden zu Beginn und am Ende des Studienzeitraums Untersuchungen statt. Zusätzlich wurde der Genotyp MTHFR C677T bestimmt. In beiden Studien protokollierten die Probanden während und außerhalb der Studie ihr Ernährungsverhalten mithilfe von 4-Tage-Schätzprotokollen.

Auch in der Humanstudie 2 wurden die untersuchten Lipidparameter durch die Intervention mit täglich 3 g PL im Vergleich zu 2,8 g Soja-PL nicht unterschiedlich beeinflusst. Lediglich Gesamt-C wurde innerhalb der Milch-PL-Gruppe signifikant um etwa 3 % gesenkt. In der Humanstudie 2 wurde der Insulinspiegel in der Milch-PL-Gruppe, nicht aber in der Soja-PL-Gruppe gesenkt. Insulin und HOMA-IR wurden nicht verändert. Auch in der Humanstudie 2 zeigte sich bei der Aktivität der GGT ein signifikanter Interventionseffekt, die Aktivität nahm in der Milch-PL-Gruppe leicht ab und in der Soja-PL-Gruppe leicht zu, die beiden anderen Leberenzyme wurden durch die Interventionen allerdings nicht beeinflusst.

Die Auswertung der Ernährungsprotokolle zeigte in der Humanstudie 1, dass sich die Probanden beider Interventionsgruppen in der Energie-, und Nährstoffzufuhr sowie ihrem Ernährungsverhalten nicht unterschieden, in der Humanstudie 2 nahmen die Probanden der Milch-PL-Gruppe signifikant weniger Energie und Kohlenhydrate auf als die Probanden der Soja-PL-Gruppe, unterschieden sich aber in ihrem weiteren Lebensmittelverzehr nicht voneinander.

Die Humanstudien zeigen, dass Milch-PL im Vergleich zu Milch-TG mit ähnlichem Fettsäurenmuster und im Vergleich zu Soja-PL keine günstigere Wirkung auf den Lipidstoffwechsel und weitere Risikoparameter für HKE haben. Somit wurde unter diesen Bedingungen keine präventive Wirkung der Milch-PL nachgewiesen. Dagegen haben Milch-PL möglicherweise einen leberprotektiven Effekt im Vergleich zu den untersuchten Kontrollen.

## 7 Summary

Cardiovascular diseases (CVD) are a group of disorders of the heart and blood vessels and remain the biggest cause of deaths worldwide. Disorders of the lipid metabolism are among the main risk factors for CVD and include elevated low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and total cholesterol (total-C), as well as decreased high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) concentrations in plasma. The ratio of total-C/HDL-C is the strongest predictor for CVD such as ischemic heart disease.

Phospholipids (PL) are amphipathic lipids. There are two categories or classes of phospholipids, namely glycerophospholipids and sphingophospholipids. In glycerophospholipids, the hydrophilic head group is composed of phosphate and an amino- or sugar alcohol, while two fatty acids bound to glycerol form the hydrophobic tail. In sphingolipids the tail is composed of the hydrocarbon chain of the sphingoid base and one fatty acid. High doses of dietary PL can reduce intestinal cholesterol absorption and can thus influence lipid metabolism. PL may also have signaling functions. The effect of PL depends on the class of the PL as well as on chain length and number of double bonds of the FA residues. It may be more pronounced with longer and more saturated fatty acids. To date, there is only one human intervention study that has examined the long-term effects of milk-PL on lipid metabolism and risk factors for CVD.

To investigate the effect of milk-PL on lipid metabolism and on other risk factors for CVD, two parallel, randomized, controlled and double-blind human intervention studies were conducted. In Study 1, 62 overweight and obese men (body mass index  $30,8 \pm 2,4$  kg/m<sup>2</sup>,  $62,5 \pm 6,4$  years of age) were randomly assigned to milk-PL or milk triglyceride intervention. They consumed 200 ml/d of milk enriched either with 2 g milk-PL or 2 g milk triglycerides, which have a similar fatty acid pattern. Anthropometric data and venous blood samples for biomarker analysis were collected at the beginning and after the 8-weeks intervention period. Parameters of lipid and carbohydrate metabolism as well as inflammation markers were determined. The primary parameter was the ratio of total-C/HDL-C. Participants kept also 4-day food records twice, namely during and outside the intervention period.

In Study 2, 57 men consumed 250 ml/d of milk for seven weeks, which was either enriched with 3 g milk-PL or 2.8 g soy-PL. The design of the study and parameters analysed were identical to Study 1. In addition, the genotype MTHFR C677T was determined in this study.



In Study 1 consumption of 2 g milk PL did not affect plasma lipids (total-C, LDL-C, TG, Apo B, Lp (a), Apo A1 and HDL-C). Glucose concentration was slightly but significantly decreased in the control but not in the milk-PL group. Insulin concentration and HOMA were not changed. There was a significant intervention effect on  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT). Activity of GGT and alanine transaminase (ALT) increased in the control group approximately by 18 % and 16 %, respectively, but did not change in the milk-PL group. Activity of aspartate transaminase (AST) was reduced by 6% within the milk-PL-group, but not within the control-group.

In Study 2, consumption of soy- or milk-derived PL did not influence lipid parameters differently. Total-C was significantly decreased by 3% within the milk-PL-group, but not within the soy-PL-group. Concentration of insulin decreased in the soy-PL group, but not in the milk-PL group. Insulin and HOMA were not changed. There was a significant intervention effect on GGT activity in that the activity was slightly increased in the soy-PL-group and slightly decreased in the milk-PL-group. The activity of ALT and AST was not affected by intervention.

Energy and nutrient intake, as well as dairy consumption of the participants in Study 1 were comparable between the milk-PL-group and control-group. In Study 2 subjects of the milk-PL group had a lower energy and carbohydrate intake than those of the soy-PL group. But dairy consumption was not different.

The consumption of milk and soy-PL did not change lipid-levels and other risk-parameters for CVD. Under these conditions dietary supplementation of 2 respective 3 g milk-PL or 2.8 g soy-PL did not modify CVD risk.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abegunde, D.O.; Mathers, C.D.; Adam, T.; Ortegon, M.; and Strong, K. (2007): The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries. *Lancet* 370: 1929-1938.
- Abratte, C.M.; Wang, W.; Li, R.; Moriarty, D.J.; and Caudill, M.A. (2008): Folate intake and the MTHFR C677T genotype influence choline status in young Mexican American women. *J. Nutr. Biochem.* 19: 158-165.
- Akesson, B. (1982): Content of phospholipids in human diets studied by the duplicate-portion technique. *Br. J. Nutr.* 47: 223-229.
- Allender, S.; Scarborough, P.; Peto, V.; Rayner, M.; Leal, J.; Luengo-Fernandez, R.; and Gray, A. (2008): European cardiovascular disease statistics. *European Heart Network* (ed.), Oxford.
- Alvaro, D.; Cantafora, A.; Attili, A.F.; Ginanni, C.S.; De, L.C.; Minervini, G.; Di, B.A.; and Angelico, M. (1986): Relationships between bile salts hydrophilicity and phospholipid composition in bile of various animal species. *Comp Biochem. Physiol B* 83: 551-554.
- American Institute of Medicine (2000): Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, Folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline. *National academy press*, Washington, D.C.
- Anon (2011): Notable advances 2011. *Nat Med* 17: 1540-1541.
- Arbeitsgruppe Zusatzstofftechnologie und -Analytik (1974): Emulgatoren Teil II: Einzeldarstellungen: Lecithin. *Fachgruppe für Lebensmittelchemie und gerichtliche Chemie, Gesellschaft Deutscher Chemiker* (ed.), Frankfurt am Main.
- Ballantyne, C.M. and Hoogeveen, R.C. (2003): Role of lipid and lipoprotein profiles in risk assessment and therapy. *Am. Heart J.* 146: 227-233.
- Barrenetxe, J.; Aranguren, P.; Grijalba, A.; Martinez-Penuela, J.M.; Marzo, F.; and Urdaneta, E. (2006): Effect of dietary quercetin and sphingomyelin on intestinal nutrient absorption and animal growth. *Br. J. Nutr.* 95: 455-461.
- Barter, P.J. and Rye, K.A. (2006): The rationale for using apoA-I as a clinical marker of cardiovascular risk. *J. Intern. Med.* 259: 447-454.
- Basu, A.; Devaraj, S.; and Jialal, I. (2006): Dietary factors that promote or retard inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26: 995-1001.
- Beil, F.U. and Grundy, S.M. (1980): Studies on plasma lipoproteins during absorption of exogenous lecithin in man. *J. Lipid Res.* 21: 525-536.

- Bidulescu, A.; Chambless, L.E.; Siega-Riz, A.M.; Zeisel, S.H.; and Heiss, G. (2007): Usual choline and betaine dietary intake and incident coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *BMC. Cardiovasc. Disord.* 7: 20.
- Bitman, J. and Wood, D.L. (1990): Changes in milk fat phospholipids during lactation. *J. Dairy Sci.* 73: 1208-1216.
- Botto, L.D. and Yang, Q. (2000): 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 151: 862-877.
- Buchman, A.L.; Dubin, M.D.; Moukarzel, A.A.; Jenden, D.J.; Roch, M.; Rice, K.M.; Gornbein, J.; and Ament, M.E. (1995): Choline deficiency: a cause of hepatic steatosis during parenteral nutrition that can be reversed with intravenous choline supplementation. *Hepatology* 22: 1399-1403.
- Burgess, J.W.; Neville, T.A.; Rouillard, P.; Harder, Z.; Beanlands, D.S.; and Sparks, D.L. (2005): Phosphatidylinositol increases HDL-C levels in humans. *J. Lipid Res.* 46: 350-355.
- Cao, Q.; Mak, K.M.; and Lieber, C.S. (2006): DLPC and SAME combined prevent leptin-stimulated TIMP-1 production in LX-2 human hepatic stellate cells by inhibiting HO-mediated signal transduction. *Liver Int.* 26: 221-231.
- Carr, T.P. and Jesch, E.D. (2006): Food components that reduce cholesterol absorption. *Adv. Food Nutr. Res.* 51: 165-204.
- Castelli, W.P. (1990): The role of plasma lipids as predictors of risk for coronary heart disease. *Drugs* 40 Suppl 1: 1-4.
- Chen, Z.Y.; Jiao, R.; and Ma, K.Y. (2008): Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods. *J. Agric. Food Chem.* 56: 8761-8773.
- Childs, M.T.; Bowlin, J.A.; Ogilvie, J.T.; Hazzard, W.R.; and Albers, J.J. (1981): The contrasting effects of a dietary soya lecithin product and corn oil on lipoprotein lipids in normolipidemic and familial hypercholesterolemic subjects. *Atherosclerosis* 38: 217-228.
- Cho, E.; Zeisel, S.H.; Jacques, P.; Selhub, J.; Dougherty, L.; Colditz, G.A.; and Willett, W.C. (2006): Dietary choline and betaine assessed by food-frequency questionnaire in relation to plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 83: 905-911.
- Clay, M.A.; Pyle, D.H.; Rye, K.A.; and Barter, P.J. (2000): Formation of spherical, reconstituted high density lipoproteins containing both apolipoproteins A-I and A-II is mediated by lecithin:cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 275: 9019-9025.
- Cohn, J.S.; Kamili, A.; Wat, E.; Chung, R.W.; and Tandy, S. (2010a): Dietary phospholipids and intestinal cholesterol absorption. *Nutrients* 2: 116-127.

- Cohn, J.S.; Kamili, A.; Wat, E.; Chung, R.W.; and Tandy, S. (2010b): Reduction in intestinal cholesterol absorption by various food components: mechanisms and implications. *Atheroscler. Suppl* 11: 45-48.
- Crider, K.S.; Zhu, J.H.; Hao, L.; Yang, Q.H.; Yang, T.P.; Gindler, J.; Maneval, D.R.; Quinlivan, E.P.; Li, Z.; Bailey, L.B.; and Berry, R.J. (2011): MTHFR 677C->T genotype is associated with folate and homocysteine concentrations in a large, population-based, double-blind trial of folic acid supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.* 93: 1365-1372.
- da Costa, K.A.; Kozyreva, O.G.; Song, J.; Galanko, J.A.; Fischer, L.M.; and Zeisel, S.H. (2006): Common genetic polymorphisms affect the human requirement for the nutrient choline. *FASEB J.* 20: 1336-1344.
- Davis, H.R.; Tershakovec, A.M.; Tomassini, J.E.; and Musliner, T. (2011): Intestinal sterol transporters and cholesterol absorption inhibition. *Curr. Opin. Lipidol.* 22: 467-478.
- Detopoulou, P.; Panagiotakos, D.B.; Antonopoulou, S.; Pitsavos, C.; and Stefanadis, C. (2008): Dietary choline and betaine intakes in relation to concentrations of inflammatory markers in healthy adults: the ATTICA study. *Am. J. Clin. Nutr.* 87: 424-430.
- Dewettinck, K.; Rombaut, R.; Thienpont, N.; Le, T.T.; Messens, K.; and Van Camp, J. (2008): Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int. Dairy J.* 18: 436-457.
- DGE, 2012. Die Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr - D-A-CH Referenzwerte der DGE, ÖGE, SGE/SVE. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (ed.), Umschau-Verlag, Bonn.
- Duan, R.D. (2011): Physiological functions and clinical implications of sphingolipids in the gut. *J. Dig. Dis.* 12: 60-70.
- Eckhardt, E.R.; Wang, D.Q.; Donovan, J.M.; and Carey, M.C. (2002): Dietary sphingomyelin suppresses intestinal cholesterol absorption by decreasing thermodynamic activity of cholesterol monomers. *Gastroenterology* 122: 948-956.
- European Food Safety Authority (2011): Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to choline and contribution to normal lipid metabolism (ID 3186), maintenance of normal liver function (ID 1501), contribution to normal homocysteine metabolism (ID 3090), maintenance of normal neurological function (ID 1502), contribution to normal cognitive function (ID 1502), and brain and neurological development (ID 1503) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 9: 2056-2078.
- Fayard, E.; Auwerx, J.; and Schoonjans, K. (2004): LXR-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends Cell Biol.* 14: 250-260.

- Fischer, L.M.; da Costa, K.A.; Kwock, L.; Galanko, J.; and Zeisel, S.H. (2010): Dietary choline requirements of women: effects of estrogen and genetic variation. *Am. J. Clin. Nutr.* 92: 1113-1119.
- Folsom, A.R.; Yatsuya, H.; Nettleton, J.A.; Lutsey, P.L.; Cushman, M.; and Rosamond, W.D. (2011): Community prevalence of ideal cardiovascular health, by the American Heart Association definition, and relationship with cardiovascular disease incidence. *J. Am. Coll. Cardiol.* 57: 1690-1696.
- Frosst, P.; Blom, H.J.; Milos, R.; Goyette, P.; Sheppard, C.A.; Matthews, R.G.; Boers, G.J.; den, H.M.; Kluijtmans, L.A.; and van den Heuvel, L.P. (1995): A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.* 10: 111-113.
- Garmy, N.; Taieb, N.; Yah, N.; and Fantini, J. (2005a): Apical uptake and transepithelial transport of sphingosine monomers through intact human intestinal epithelial cells: physicochemical and molecular modeling studies. *Arch. Biochem. Biophys.* 440: 91-100.
- Garmy, N.; Taieb, N.; Yah, N.; and Fantini, J. (2005b): Interaction of cholesterol with sphingosine: physicochemical characterization and impact on intestinal absorption. *J. Lipid Res.* 46: 36-45.
- Genser, B.; Dias, K.C.; Siekmeier, R.; Stojakovic, T.; Grammer, T.; and Maerz, W. (2011): Lipoprotein (a) and risk of cardiovascular disease--a systematic review and meta analysis of prospective studies. *Clin. Lab* 57: 143-156.
- Givens, D.I. (2012): Milk in the diet: good or bad for vascular disease? *Proc. Nutr. Soc.* 71: 98-104.
- Glass, C.K. and Witztum, J.L. (2001): Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104: 503-516.
- Gordon, T.; Castelli, W.P.; Hjortland, M.C.; Kannel, W.B.; and Dawber, T.R. (1977): High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am. J. Med.* 62: 707-714.
- Greten, H.; Raetzer, H.; Stiehl, A.; and Schettler, G. (1980): The effect of polyunsaturated phosphatidylcholine on plasma lipids and fecal sterol excretion. *Atherosclerosis* 36: 81-88.
- Griffith, O.W. (1985) Glutathione and Glutathione Disulphide. In Bergmeyer, H.U. and Bergmeyer Jürgen (ed.), *Methods of enzymatic analysis. Metabolites 3: lipids, amino acids and related compounds.* 521-529. VCH. Weinheim.
- Grundy, S.M. (1988): HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* 319: 24-33.
- Grundy, S.M.; Cleeman, J.I.; Merz, C.N.; Brewer, H.B., Jr.; Clark, L.T.; Hunninghake, D.B.; Pasternak, R.C.; Smith, S.C., Jr.; and Stone, N.J. (2004): Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: e149-e161.

- Gueant-Rodriguez, R.M.; Gueant, J.L.; Debard, R.; Thirion, S.; Hong, L.X.; Bronowicki, J.P.; Namour, F.; Chabi, N.W.; Sanni, A.; Anello, G.; Bosco, P.; Romano, C.; Amouzou, E.; Arrieta, H.R.; Sanchez, B.E.; Romano, A.; Herbeth, B.; Guillard, J.C.; and Mutchinick, O.M. (2006): Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am. J. Clin. Nutr.* 83: 701-707.
- Guerrero, A.L.; Colvin, R.M.; Schwartz, A.K.; Molleston, J.P.; Murray, K.F.; Diehl, A.; Mohan, P.; Schwimmer, J.B.; Lavine, J.E.; Torbenson, M.S.; and Scheimann, A.O. (2012): Choline intake in a large cohort of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 95: 892-900.
- Hilbrich, L.; Truelsen, T.; and Yusuf, S. (2007): Stroke and cardiovascular diseases: the need for a global approach for prevention and drug development. *Int. J. Stroke* 2: 104-108.
- Hoffmann, I.; Kohl, M.; Groeneveld, M.; and Leitzmann, C. (1994): Development and validation of a new instrument to measure food intake. *Am. J. Clin. Nutr.* 284S-284S.
- Hohenester, S. and Beuers, U. (2011): Phosphatidylcholines as regulators of glucose and lipid homeostasis: promises and potential risks. *Hepatology* 54: 2265-2267.
- Hollenbeck, C.B. (2010): The importance of being choline. *J. Am. Diet. Assoc.* 110: 1162-1165.
- Holmes, M.V.; Newcombe, P.; Hubacek, J.A.; Sofat, R.; Ricketts, S.L.; Cooper, J.; Breteler, M.M.; Bautista, L.E.; Sharma, P.; Whittaker, J.C.; Smeeth, L.; Fowkes, F.G.; Algra, A.; Shmeleva, V.; Szolnoki, Z.; Roest, M.; Linnebank, M.; Zacho, J.; Nalls, M.A.; Singleton, A.B.; Ferrucci, L.; Hardy, J.; Worrall, B.B.; Rich, S.S.; Matarin, M.; Norman, P.E.; Flicker, L.; Almeida, O.P.; van Bockxmeer, F.M.; Shimokata, H.; Khaw, K.T.; Wareham, N.J.; Bobak, M.; Sterne, J.A.; Smith, G.D.; Talmud, P.J.; van, D.C.; Humphries, S.E.; Price, J.F.; Ebrahim, S.; Lawlor, D.A.; Hankey, G.J.; Meschia, J.F.; Sandhu, M.S.; Hingorani, A.D.; and Casas, J.P. (2011): Effect modification by population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomised trials. *Lancet* 378: 584-594.
- Hooper, A.J.; Adams, L.A.; and Burnett, J.R. (2011): Genetic determinants of hepatic steatosis in man. *J. Lipid Res.* 52: 593-617.
- Howe, J. C.; Williams, J.; Holden, J. M.; Zeisel, S. H.; and Mar, M. H. (2004): USDA Database for the choline content of common foods. *Nutrient Data Laboratory, Agricultural Research Service and United States Department of Agriculture* (ed.), Maryland.
- Huth, P.J. and Park, K.M. (2012): Influence of dairy product and milk fat consumption on cardiovascular disease risk: a review of the evidence. *Adv. Nutr.* 3: 266-285.



- Imaizumi, K.; Mawatari, K.; Murata, M.; Ikeda, I.; and Sugano, M. (1983): The contrasting effect of dietary phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine on serum lipoproteins and liver lipids in rats. *J. Nutr.* 113: 2403-2411.
- Imaizumi, K.; Murata, M.; and Sugano, M. (1982): Effect of dietary polyunsaturated phospholipid on the chemical composition of serum lipoproteins in rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 28: 281-294.
- Ingelsson, E.; Schaefer, E.J.; Contois, J.H.; McNamara, J.R.; Sullivan, L.; Keyes, M.J.; Pencina, M.J.; Schoonmaker, C.; Wilson, P.W.; D'Agostino, R.B.; and Vasan, R.S. (2007): Clinical utility of different lipid measures for prediction of coronary heart disease in men and women. *JAMA* 298: 776-785.
- Innis, S.M. and Davidson, A.G. (2008): Cystic fibrosis and nutrition: linking phospholipids and essential fatty acids with thiol metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 28: 55-72.
- Innis, S.M.; Davidson, A.G.; Melynk, S.; and James, S.J. (2007): Choline-related supplements improve abnormal plasma methionine-homocysteine metabolites and glutathione status in children with cystic fibrosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 85: 702-708.
- Ivanov, A.; Nash-Barboza, S.; Hinkis, S.; and Caudill, M.A. (2009): Genetic variants in phosphatidylethanolamine N-methyltransferase and methylenetetrahydrofolate dehydrogenase influence biomarkers of choline metabolism when folate intake is restricted. *J. Am. Diet. Assoc.* 109: 313-318.
- Iwata, T.; Hoshi, S.; Takehisa, F.; Tsutsumi, K.; Furukawa, Y.; and Kimura, S. (1992): The effect of dietary safflower phospholipid and soybean phospholipid on plasma and liver lipids in rats fed a hypercholesterolemic diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 38: 471-479.
- Iwata, T.; Kimura, Y.; Tsutsumi, K.; Furukawa, Y.; and Kimura, S. (1993): The effect of various phospholipids on plasma lipoproteins and liver lipids in hypercholesterolemic rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 39: 63-71.
- Jiang, Y.; Noh, S.K.; and Koo, S.I. (2001): Egg phosphatidylcholine decreases the lymphatic absorption of cholesterol in rats. *J. Nutr.* 131: 2358-2363.
- Jimenez, M.A.; Scarino, M.L.; Vignolini, F.; and Mengheri, E. (1990): Evidence that polyunsaturated lecithin induces a reduction in plasma cholesterol level and favorable changes in lipoprotein composition in hypercholesterolemic rats. *J. Nutr.* 120: 659-667.
- Keenan, T. and Patton, S. (1995) The milk lipid globule membrane. In Jensen, R. (ed.), *Handbook of milk composition*. 5-50. *Academic Press Inc.* New York, USA.
- Kerner, W. and Brückel, J. (2011): Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie und Stoffwechsel* 6 (suppl. 2): 107-110.

- Kesaniemi, Y.A. and Grundy, S.M. (1986): Effects of dietary polyenylphosphatidylcholine on metabolism of cholesterol and triglycerides in hypertriglyceridemic patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 43: 98-107.
- Knuiman, J.T.; Beynen, A.C.; and Katan, M.B. (1989): Lecithin intake and serum cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* 49: 266-268.
- Koebnick, C., Dieter, G., Zunft HJF, and Hoffmann, I., 2003. Ernährungsprotokoll. *Deutsches Institut für Ernährungsforschung (DifE), Institut für Ernährungswissenschaft Justus-Liebig-Universität Gießen* (ed.).
- Koo, S.I. and Noh, S.K. (2001): Phosphatidylcholine inhibits and lysophosphatidylcholine enhances the lymphatic absorption of alpha-tocopherol in adult rats. *J. Nutr.* 131: 717-722.
- Koolman, J. and Röhm, K.H., 2003. Taschenatlas der Biochemie. *Thieme Verlag*, Stuttgart.
- Küllenberg, D.; Taylor, L.A.; Schneider, M.; and Massing, U. (2012): Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis.* 11: 3.
- Kusmierek, K.; Chwatko, G.; Glowacki, R.; Kubalcyk, P.; and Bald, E. (2011): Ultraviolet derivatization of low-molecular-mass thiols for high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis analysis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879: 1290-1307.
- Lamaziere, A. and Wolf, C. (2010): Phosphatidylcholine and PPARalpha: a relevant connection in liver disease? *Gastroenterol. Clin. Biol.* 34: 250-251.
- Le Kim, D. and Betzing, H. (1976): Intestinal absorption of polyunsaturated phosphatidylcholine in the rat. *Hoppe Seylers. Z. Physiol Chem.* 357: 1321-1331.
- LeBlanc, M.J.; Brunet, S.; Bouchard, G.; Lamireau, T.; Yousef, I.M.; Gavino, V.; Levy, E.; and Tuchweber, B. (2003): Effects of dietary soybean lecithin on plasma lipid transport and hepatic cholesterol metabolism in rats. *J. Nutr. Biochem.* 14: 40-48.
- LeBlanc, M.J.; Gavino, V.; Perea, A.; Yousef, I.M.; Levy, E.; and Tuchweber, B. (1998): The role of dietary choline in the beneficial effects of lecithin on the secretion of biliary lipids in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1393: 223-234.
- Lee, J.E.; Jacques, P.F.; Dougherty, L.; Selhub, J.; Giovannucci, E.; Zeisel, S.H.; and Cho, E. (2010): Are dietary choline and betaine intakes determinants of total homocysteine concentration? *Am. J. Clin. Nutr.* 91: 1303-1310.
- Lee, J.M.; Lee, Y.K.; Mamrosh, J.L.; Busby, S.A.; Griffin, P.R.; Pathak, M.C.; Ortlund, E.A.; and Moore, D.D. (2011): A nuclear-receptor-dependent phosphatidylcholine pathway with antidiabetic effects. *Nature* 474: 506-510.



- Lemieux, I.; Lamarche, B.; Couillard, C.; Pascot, A.; Cantin, B.; Bergeron, J.; Dagenais, G.R.; and Despres, J.P. (2001): Total cholesterol/HDL cholesterol ratio vs LDL cholesterol/HDL cholesterol ratio as indices of ischemic heart disease risk in men: the Quebec Cardiovascular Study. *Arch. Intern. Med.* 161: 2685-2692.
- Lewington, S.; Whitlock, G.; Clarke, R.; Sherliker, P.; Emberson, J.; Halsey, J.; Qizilbash, N.; Peto, R.; and Collins, R. (2007): Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet* 370: 1829-1839.
- Lewis, G.F. and Rader, D.J. (2005): New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ. Res.* 96: 1221-1232.
- Libby, P. (2002): Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874.
- Lieber, C.S.; Leo, M.A.; Cao, Q.; Mak, K.M.; Ren, C.; Ponomarenko, A.; Wang, X.; and Decarli, L.M. (2007): The combination of S-adenosylmethionine and dilinoleoylphosphatidylcholine attenuates non-alcoholic steatohepatitis produced in rats by a high-fat diet. *Nutr. Res.* 27: 565-573.
- Lindgren, V.; Luskey, K.L.; Russell, D.W.; and Francke, U. (1985): Human genes involved in cholesterol metabolism: chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase with cDNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82: 8567-8571.
- Lloyd-Jones, D.M.; Leip, E.P.; Larson, M.G.; D'Agostino, R.B.; Beiser, A.; Wilson, P.W.; Wolf, P.A.; and Levy, D. (2006): Prediction of lifetime risk for cardiovascular disease by risk factor burden at 50 years of age. *Circulation* 113: 791-798.
- Lönn, M.E.; Dennis, J.M.; and Stocker, R. (2012): Actions of "antioxidants" in the protection against atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med* <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.027>.
- Lopez, C.; Briard-Bion, V.; Menard, O.; Rousseau, F.; Pradel, P.; and Besle, J.M. (2008): Phospholipid, sphingolipid, and fatty acid compositions of the milk fat globule membrane are modified by diet. *J. Agric. Food Chem.* 56: 5226-5236.
- Mager, A.; Battler, A.; Birnbaum, Y.; Magal, N.; and Shohat, M. (2002): Plasma homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase genotypes, and age at onset of symptoms of myocardial ischemia. *Am. J. Cardiol.* 89: 919-923.
- Marti-Carvajal, A.J.; Sola, I.; Lathyris, D.; and Salanti, G. (2009): Homocysteine lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD006612.
- Matthews, D.R.; Hosker, J.P.; Rudenski, A.S.; Naylor, B.A.; Treacher, D.F.; and Turner, R.C. (1985): Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-419.

- Mikhailidis, D.P.; Lawson, R.W.; McCormick, A.L.; Sibbring, G.C.; Tershakovec, A.M.; Davies, G.M.; and Tunceli, K. (2011): Comparative efficacy of the addition of ezetimibe to statin vs statin titration in patients with hypercholesterolaemia: systematic review and meta-analysis. *Curr. Med. Res. Opin.* 27: 1191-1210.
- Mikhailidis, D.P.; Sibbring, G.C.; Ballantyne, C.M.; Davies, G.M.; and Catapano, A.L. (2007): Meta-analysis of the cholesterol-lowering effect of ezetimibe added to ongoing statin therapy. *Curr. Med. Res. Opin.* 23: 2009-2026.
- Millan, J.; Pinto, X.; Munoz, A.; Zuniga, M.; Rubies-Prat, J.; Pallardo, L.F.; Masana, L.; Mangas, A.; Hernandez-Mijares, A.; Gonzalez-Santos, P.; Ascaso, J.F.; and Pedro-Botet, J. (2009): Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vasc. Health Risk Manag.* 5: 757-765.
- Miller, M.; Seidler, A.; Kwiterovich, P.O.; and Pearson, T.A. (1992): Long-term predictors of subsequent cardiovascular events with coronary artery disease and 'desirable' levels of plasma total cholesterol. *Circulation* 86: 1165-1170.
- Mourad, A.M.; de Carvalho, P.E.; Mazzola, P.G.; Sabha, M.; and Moriel, P. (2010): Influence of soy lecithin administration on hypercholesterolemia. *Cholesterol* 2010: 824813.
- Müller, H.; Hellgren, L.I.; Olsen, E.; and Skrede, A. (2004): Lipids rich in phosphatidylethanolamine from natural gas-utilizing bacteria reduce plasma cholesterol and classes of phospholipids: a comparison with soybean oil. *Lipids* 39: 833-841.
- Murata, M.; Imaizumi, K.; and Sugano, M. (1982): Effect of dietary phospholipids and their constituent bases on serum lipids and apolipoproteins in rats. *J. Nutr.* 112: 1805-1808.
- Murata, M.; Imaizumi, K.; and Sugano, M. (1983): Hepatic secretion of lipids and apolipoproteins in rats fed soybean phospholipid and soybean oil. *J. Nutr.* 113: 1708-1716.
- Navab, M.; Hama, S.; Hough, G.; and Fogelman, A.M. (2003): Oral synthetic phospholipid (DMPC) raises high-density lipoprotein cholesterol levels, improves high-density lipoprotein function, and markedly reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 108: 1735-1739.
- Niculescu, M.D. and Zeisel, S.H. (2002): Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J. Nutr.* 132: 2333S-2335S.
- Nieuwenhuizen, W.F.; Duivenvoorden, I.; Voshol, P.; Rensen, P.; van Duyvenvoorde W.; Romijn, J.A.; Emeis, J.; and Havekes, L.M. (2007): Dietary sphingolipids lower plasma cholesterol and triacylglycerol and prevent liver steatosis. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109: 994-997.
- Nilsson, A. and Duan, R.D. (2006): Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin. *J. Lipid Res.* 47: 154-171.

- Nilsson, A., Hertervig, E., and Duan, R.D. (2003) Digestion and Absorption of Sphingolipids in Food. In Szuhaj, B. and van Nieuwenhuyzen, W. (ed.), Nutrition and Biochemistry of Phospholipids. 70-79. AOCS. Boulder.
- Noh, S.K. and Koo, S.I. (2003): Egg sphingomyelin lowers the lymphatic absorption of cholesterol and alpha-tocopherol in rats. *J. Nutr.* 133: 3571-3576.
- Noh, S.K. and Koo, S.I. (2004): Milk sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats. *J. Nutr.* 134: 2611-2616.
- Nyberg, L.; Duan, R.D.; and Nilsson, A. (2000): A mutual inhibitory effect on absorption of sphingomyelin and cholesterol. *J. Nutr. Biochem.* 11: 244-249.
- O'Brien, B.C. and Andrews, V.G. (1993): Influence of dietary egg and soybean phospholipids and triacylglycerols on human serum lipoproteins. *Lipids* 28: 7-12.
- Ohlsson, L.; Burling, H.; Duan, R.D.; and Nilsson, A. (2010a): Effects of a sphingolipid-enriched dairy formulation on postprandial lipid concentrations. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64: 1344-1349.
- Ohlsson, L.; Burling, H.; and Nilsson, A. (2009): Long term effects on human plasma lipoproteins of a formulation enriched in butter milk polar lipid. *Lipids Health Dis.* 8: 44.
- Ohlsson, L.; Hertervig, E.; Jonsson, B.A.; Duan, R.D.; Nyberg, L.; Svernlöv, R.; and Nilsson, A. (2010b): Sphingolipids in human ileostomy content after meals containing milk sphingomyelin. *Am. J. Clin. Nutr.* 91: 672-678.
- Olthoff, M.R.; Brink, E.J.; Katan, M.B.; and Verhoef, P. (2005): Choline supplemented as phosphatidylcholine decreases fasting and postmethionine-loading plasma homocysteine concentrations in healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* 82: 111-117.
- Oosthuizen, W.; Vorster, H.H.; Vermaak, W.J.; Smuts, C.M.; Jerling, J.C.; Veldman, F.J.; and Burger, H.M. (1998): Lecithin has no effect on serum lipoprotein, plasma fibrinogen and macro molecular protein complex levels in hyperlipidaemic men in a double-blind controlled study. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52: 419-424.
- Osthoﬀ, G.; Hugo, A.; van, W.P.; de, W.M.; and Meyer, S. (2010): Characterization of a spray-dried soymilk powder and changes observed during storage. *Food Sci. Technol. Int.* 16: 169-178.
- Pande, R.L. (2012): Approach to lipid therapy in the patient with atherosclerotic vascular disease. *Curr. Treat. Options. Cardiovasc. Med.* 14: 177-183.
- Pandor, A.; Ara, R.M.; Tumor, I.; Wilkinson, A.J.; Paisley, S.; Duenas, A.; Durrington, P.N.; and Chilcott, J. (2009): Ezetimibe monotherapy for cholesterol lowering in 2,722 people: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Intern. Med.* 265: 568-580.
- Parthasarathy, S.; Subbaiah, P.V.; and Ganguly, J. (1974): The mechanism of intestinal absorption of phosphatidylcholine in rats. *Biochem. J.* 140: 503-508.

- Polichetti, E.; Janisson, A.; de la Porte, P.L.; Portugal, H.; Leonardi, J.; Luna, A.; La, D.P.; and Chanussot, F. (2000): Dietary polyenylphosphatidylcholine decreases cholesterolemia in hypercholesterolemic rabbits: role of the hepatobiliary axis. *Life Sci.* 67: 2563-2576.
- Polichetti, E.; Janisson, A.; Iovanna, C.; Portugal, H.; Mekki, N.; Lorec, A.M.; Pauli, A.M.; Luna, A.; Lairon, D.; La, D.P.; Lafont, H.; and Chanussot, F. (1998): Stimulation of the apo A1-high density lipoprotein system by dietary soyabean lecithin in humans. *J. Nutr. Biochem.* 9: 659-664.
- Prack, M., Sanborn, T., Waugh, D., Simkin, H., Bennett Clark, S., and Small, D. (1983) Effects of polyunsaturated lecithin on plasma and lipoprotein cholesterol and fatty acids in normal men. In Perkins, E. and Vissek, W. (ed.), Dietary fats and health. 689-697. *American Oil Chemist's Society*. Champaign, IL.
- Rampone, A.J. (1973): The effect of lecithin on intestinal cholesterol uptake by rat intestine in vitro. *J. Physiol* 229: 505-514.
- Rayner, M.; Allender, S.; and Scarborough, P. (2009): Cardiovascular disease in Europe. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 16 Suppl 2: S43-S47.
- Richard, C.; Couture, P.; Desroches, S.; Benjannet, S.; Seidah, N.G.; Lichtenstein, A.H.; and Lamarche, B. (2012): Effect of the Mediterranean diet with and without weight loss on surrogate markers of cholesterol homeostasis in men with the metabolic syndrome. *Br. J. Nutr.* 107: 705-711.
- Ridker, P.M.; Stampfer, M.J.; and Rifai, N. (2001): Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA* 285: 2481-2485.
- Ristic Medic, D.; Ristic, V.; Arsic, A.; Postic, M.; Ristic, G.; Blazencic, M., V; and Tepsic, J. (2006): Effects of soybean D-LeciVita product on serum lipids and fatty acid composition in type 2 diabetic patients with hyperlipidemia. *Nutr. Metab Cardiovasc. Dis.* 16: 395-404.
- Ristic Medic, D.; Ristic, V.; Tepsic, V.; Ranic, M.; Ristic, G.; Vrbaski, S.; and Estelecki, I. (2003): Effect of Soybean Leci-Vita product on serum lipids and fatty acid composition in patients with elevated serum cholesterol and triglyceride levels. *Nutrition Research* 23: 465-477.
- Robert Koch-Institut (2006): Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Robert Koch-Institut (ed.), Berlin.
- Robert Koch-Institut (2011): Sterblichkeit, Todesursachen und regionale Unterschiede. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 52. Robert Koch-Institut (ed.), Berlin.
- Rodgers, J.B. and O'Connor, P.J. (1975): Effect of phosphatidylcholine on fatty acid and cholesterol absorption from mixed micellar solutions. *Biochim. Biophys. Acta* 409: 192-200.

- Rodriguez, S.; Gaunt, T.R.; and Day, I.N. (2009): Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am. J. Epidemiol.* 169: 505-514.
- Rombaut, R.; Camp, J.V.; and Dewettinck, K. (2005): Analysis of phospho- and sphingolipids in dairy products by a new HPLC method. *J. Dairy Sci.* 88: 482-488.
- Ross, R. (1999): Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340: 115-126.
- Sánchez-Juanes, F.; Alonso, J.; Zancada, L.; and Hueso, P. (2009): Distribution and fatty acid content of phospholipids from bovine milk and bovine milk fat globule membranes. *Int. Dairy J.* 273-278.
- Schneider, H.; Braun, A.; Fullekrug, J.; Stremmel, W.; and Ehehalt, R. (2010): Lipid based therapy for ulcerative colitis-modulation of intestinal mucus membrane phospholipids as a tool to influence inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 4149-4164.
- Schulgen, G. and Schumacher, M. (2008) Cross-Over Studien. In Schumacher, M. and Schulgen, G. (ed.), *Methodik klinischer Studien*. 305-318. *Springer-Verlag*. Berlin, Heidelberg.
- Schulz, K.F.; Altman, D.G.; and Moher, D. (2010): CONSORT 2010 statement: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 1: 100-107.
- Schutte, R.; Schutte, A.E.; Huisman, H.W.; van Rooyen, J.M.; Malan, N.T.; Peter, S.; Fourie, C.M.; van der Westhuizen, F.H.; Louw, R.; Botha, C.A.; and Malan, L. (2009): Blood glutathione and subclinical atherosclerosis in African men: the SABPA Study. *Am. J. Hypertens.* 22: 1154-1159.
- Seman, L.J.; DeLuca, C.; Jenner, J.L.; Cupples, L.A.; McNamara, J.R.; Wilson, P.W.; Castelli, W.P.; Ordovas, J.M.; and Schaefer, E.J. (1999): Lipoprotein(a)-cholesterol and coronary heart disease in the Framingham Heart Study. *Clin. Chem.* 45: 1039-1046.
- Senior, J.R. (1964): Intestinal absorption of fats. *J. Lipid Res.* 5: 495-521.
- Sharrett, A.R.; Ballantyne, C.M.; Coady, S.A.; Heiss, G.; Sorlie, P.D.; Catellier, D.; and Patsch, W. (2001): Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 104: 1108-1113.
- Shirouchi, B.; Nagao, K.; Inoue, N.; Furuya, K.; Koga, S.; Matsumoto, H.; and Yanagita, T. (2008): Dietary phosphatidylinositol prevents the development of nonalcoholic fatty liver disease in Zucker (fa/fa) rats. *J. Agric. Food Chem.* 56: 2375-2379.
- Singh, I.M.; Shishehbor, M.H.; and Ansell, B.J. (2007): High-density lipoprotein as a therapeutic target: a systematic review. *JAMA* 298: 786-798.

- Snel, M.; Sleddering, M.A.; Pijl, H.; Nieuwenhuizen, W.F.; Frolich, M.; Havekes, L.M.; Romijn, J.A.; and Jazet, I.M. (2010): The effect of dietary phytosphingosine on cholesterol levels and insulin sensitivity in subjects with the metabolic syndrome. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64: 419-423.
- Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H., and Kirchhoff, E., 2008. Souci - Fachmann - Kraut. Food composition and nutrition tables. *Medpharm Scientific Publishers*, Stuttgart.
- Spann, W.; Wolfram, G.; and Zöllner, N. (1987a): Abfall der Serumlipoproteine und Anstieg der Apolipoproteine A-I und A-II nach oraler Zufuhr mehrfach ungesättigter Phospholipide. *Klin. Wochenschr.* 65: 590-595.
- Spann, W.; Wolfram, G.; and Zöllner, N. (1987b): Die Wirkungen gleicher Mengen Linolsäure in oral zugeführten, mehrfach ungesättigten Phospholipiden oder in Safloröl auf die Lipoproteine des Plasmas. *Klin. Wochenschr.* 65: 980-984.
- Stamler, J. and Neaton, J.D. (2008): The Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT)--importance then and now. *JAMA* 300: 1343-1345.
- Stampfer, M.J.; Sacks, F.M.; Salvini, S.; Willett, W.C.; and Hennekens, C.H. (1991): A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 325: 373-381.
- Stanger, O.; Herrmann, W.; Pietrzik, K.; Fowler, B.; Geisel, J.; Dierkes, J.; and Weger, M. (2003): DACH-LIGA homocystein (German, Austrian and Swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41: 1392-1403.
- Statistisches Bundesamt (2004): Gesundheit. Krankheitskosten 2002. *Statistisches Bundesamt - Pressestelle* (ed.), Wiesbaden.
- Stremmel, W.; Ehehalt, R.; Autschbach, F.; and Karner, M. (2007): Phosphatidylcholine for steroid-refractory chronic ulcerative colitis: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 147: 603-610.
- Strong, K.; Mathers, C.; and Bonita, R. (2007): Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurol.* 6: 182-187.
- Strong, K.; Mathers, C.; Leeder, S.; and Beaglehole, R. (2005): Preventing chronic diseases: how many lives can we save? *Lancet* 366: 1578-1582.
- Subbaiah, P.V.; Jiang, X.C.; Belikova, N.A.; Aizezi, B.; Huang, Z.H.; and Reardon, C.A. (2012): Regulation of plasma cholesterol esterification by sphingomyelin: Effect of physiological variations of plasma sphingomyelin on lecithin-cholesterol acyltransferase activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1821: 908-913.
- Thefeld, W. (2000): Verbreitung der Herz-Kreislauf Risikofaktoren Hypercholesterinämie, Übergewicht, Hypertonie und Rauchen in der Bevölkerung. *Gesundheitsblatt - Gesundheitsforschung -Gesundheitsschutz* 43: 415-423.



- Thomas, C.; Gioiello, A.; Noriega, L.; Strehle, A.; Oury, J.; Rizzo, G.; Macchiarulo, A.; Yamamoto, H.; Matak, C.; Pruzanski, M.; Pellicciari, R.; Auwerx, J.; and Schoonjans, K. (2009): TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab* 10: 167-177.
- Toyo'oka, T. and Imai, K. (1983): High-performance liquid chromatography and fluorometric detection of biologically important thiols, derivatized with ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulphonate (SBD-F). *J. Chromatogr.* 282: 495-500.
- Treede, I.; Braun, A.; Sparla, R.; Kuhnel, M.; Giese, T.; Turner, J.R.; Anes, E.; Kulaksiz, H.; Fullekrug, J.; Stremmel, W.; Griffiths, G.; and Ehehalt, R. (2007): Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 282: 27155-27164.
- Vesper, H.; Schmelz, E.M.; Nikolova-Karakashian, M.N.; Dillehay, D.L.; Lynch, D.V.; and Merrill, A.H., Jr. (1999): Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *J. Nutr.* 129: 1239-1250.
- Wang, H.; Du, J.; Lu, S.; Yao, Y.; Hunter, F.; and Black, D.D. (2001): Regulation of intestinal apolipoprotein A-I synthesis by dietary phosphatidylcholine in newborn swine. *Lipids* 36: 683-687.
- Wang, Y.T.; von, Z.A.; and McCormick, S.P. (2009): Dimyristoylphosphatidylcholine induces conformational changes in apoB that lowers lipoprotein(a). *J. Lipid Res.* 50: 846-853.
- Wat, E.; Tandy, S.; Kapera, E.; Kamili, A.; Chung, R.W.; Brown, A.; Rowney, M.; and Cohn, J.S. (2009): Dietary phospholipid-rich dairy milk extract reduces hepatomegaly, hepatic steatosis and hyperlipidemia in mice fed a high-fat diet. *Atherosclerosis* 205: 144-150.
- Watanabe, M.; Houten, S.M.; Wang, L.; Moschetta, A.; Mangelsdorf, D.J.; Heyman, R.A.; Moore, D.D.; and Auwerx, J. (2004): Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J. Clin. Invest* 113: 1408-1418.
- Watanabe, S.; Takahashi, T.; Tanaka, L.; Haruta, Y.; Shiota, M.; Hosokawa, M.; and Miyashita, K. (2011): The effect of milk polar lipids separated from butter serum on the lipid levels in the liver and the plasma of obese-model mouse (KK-A<sup>y</sup>). *J. funct. foods* 3: 313-320.
- Weihrauch, J.L. and Son, Y.S. (1983): The phospholipid content of foods. *JAOCS* 60: 1971-1978.
- Weltärztebund, 2008. Handbuch der Deklarationen, Erklärungen und Entschlüssen - Deutsche Fassung. *Deutscher Ärzte-Verlag*, Köln.
- WHO (2007): Prevention of cardiovascular disease: guideline for assessment and management of cardiovascular risk. *World Health Organization* (ed.), Genf.
- WHO (2010a): Global status report on noncommunicable diseases 2010. Alwan, A. (ed.), *World Health Organization* (ed.), Genf.

- WHO (2010b): International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD). *World Health Organization* (ed.), Genf.
- WHO (2011): Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Mendis, S.; Puska, P.; and Norrving, B. (ed.), *World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization*, Genf.
- Wilcken, B.; Bamforth, F.; Li, Z.; Zhu, H.; Ritvanen, A.; Renlund, M.; Stoll, C.; Alembik, Y.; Dott, B.; Czeizel, A.E.; Gelman-Kohan, Z.; Scarano, G.; Bianca, S.; Ettore, G.; Tenconi, R.; Bellato, S.; Scala, I.; Mutchinick, O.M.; Lopez, M.A.; de, W.H.; Hofstra, R.; Joutchenko, L.; Kavteladze, L.; Bermejo, E.; Martinez-Frias, M.L.; Gallagher, M.; Erickson, J.D.; Vollset, S.E.; Mastroiacovo, P.; Andria, G.; and Botto, L.D. (2003): Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J. Med. Genet.* 40: 619-625.
- Wilson, T.A.; Meservey, C.M.; and Nicolosi, R.J. (1998): Soy lecithin reduces plasma lipoprotein cholesterol and early atherogenesis in hypercholesterolemic monkeys and hamsters: beyond linoleate. *Atherosclerosis* 140: 147-153.
- Wittwer, C.T. (2009): High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum. Mutat.* 30: 857-859.
- Yan, J.; Wang, W.; Gregory, J.F., III; Malysheva, O.; Brenna, J.T.; Stabler, S.P.; Allen, R.H.; and Caudill, M.A. (2011): MTHFR C677T genotype influences the isotopic enrichment of one-carbon metabolites in folate-compromised men consuming d9-choline. *Am. J. Clin. Nutr.* 93: 348-355.
- Yao, Z.M. and Vance, D.E. (1989): Head group specificity in the requirement of phosphatidylcholine biosynthesis for very low density lipoprotein secretion from cultured hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 264: 11373-11380.
- Yunoki, K.; Renaguli, M.; Kinoshita, M.; Matsuyama, H.; Mawatari, S.; Fujino, T.; Kodama, Y.; Sugiyama, M.; and Ohnishi, M. (2010): Dietary sphingolipids ameliorate disorders of lipid metabolism in Zucker fatty rats. *J. Agric. Food Chem.* 58: 7030-7035.
- Zeisel, S.H. (2006): Choline: critical role during fetal development and dietary requirements in adults. *Annu. Rev. Nutr.* 26: 229-250.
- Zeisel, S.H. and Blusztajn, J.K. (1994): Choline and human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 14: 269-296.
- Zeisel, S.H.; da Costa, K.A.; Franklin, P.D.; Alexander, E.A.; Lamont, J.T.; Sheard, N.F.; and Beiser, A. (1991): Choline, an essential nutrient for humans. *FASEB J.* 5: 2093-2098.
- Zeisel, S.H.; Mar, M.H.; Howe, J.C.; and Holden, J.M. (2003): Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. *J. Nutr.* 133: 1302-1307.



- Zhang, J.; Handy, D.E.; Wang, Y.; Bouchard, G.; Selhub, J.; Loscalzo, J.; and Carey, M.C. (2011a): Hyperhomocysteinemia from trimethylation of hepatic phosphatidylethanolamine during cholesterol cholelithogenesis in inbred mice. *Hepatology* 54: 697-706.
- Zhang, Y.; Cheng, Y.; Hansen, G.H.; Niels-Christiansen, L.L.; Koentgen, F.; Ohlsson, L.; Nilsson, A.; and Duan, R.D. (2011b): Crucial role of alkaline sphingomyelinase in sphingomyelin digestion: a study on enzyme knockout mice. *J. Lipid Res.* 52: 771-781.
- Zhang, Y.; Lee, F.Y.; Barrera, G.; Lee, H.; Vales, C.; Gonzalez, F.J.; Willson, T.M.; and Edwards, P.A. (2006): Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103: 1006-1011.
- Zierenberg, O. and Grundy, S.M. (1982): Intestinal absorption of polyenephosphatidylcholine in man. *J. Lipid Res.* 23: 1136-1142.

## Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Maria Pfeuffer für die Überlassung des interessanten Themas, ihre Unterstützung, die Vermittlung ihres Wissens und stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Clemens Kunz gilt mein Dank für die freundliche Betreuung an der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie die Begutachtung meiner Dissertation. Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Watzl für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Meinen Kolleginnen Andrea Backhaus, Dr. Anja Fink, Dr. Daniela Graf, Dr. Eva Graf, Dr. Susanne Skrbek und Dr. Berenike Stracke möchte ich für die Freundschaft und Unterstützung über die letzten Jahre danken. Bei allen Mitarbeitern am MRI in Karlsruhe bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre, dabei gilt mein Dank insbesondere Constanze Hans. Bei Herrn PD Dr. Stephan Barth bedanke ich mich herzlich für die Ermöglichung der Genotypisierung und seine Unterstützung dabei.

Ein großer Dank gilt meinem Mann, meiner Familie und Freunden, bei denen ich immer wieder neue Energie für die Anfertigung der Arbeit sammeln konnte und die mir aufmunternd und ermutigend zur Seite standen.

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines FEI-geförderten Projekts Entwicklung eines Verfahrens zur Isolierung von Phospholipiden aus Molkenrahm und Nachweis des gesundheitlichen Potentials der Phospholipide durchgeführt. Ich danke für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und den Projektpartnern für die angenehme Zusammenarbeit.